



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Obtención de bioetanol mediante procesos de  
fermentación con levaduras: revisión bibliográfica

Obtaining bioethanol through yeast fermentation processes:  
bibliographic review

Autora

Irene Delgado Velloso

Director

Jaime Soler Herrero

Facultad de Ciencias

Año 2020

# ÍNDICE

<b>1.- RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2.- ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>3.- NECESIDAD DE HACER UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y OBJETIVO.....</b>	<b>2</b>
<b>4.- METODOLOGÍA.....</b>	<b>2</b>
<b>5.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>5.1.- CONTEXTO MEDIOAMBIENTAL, CULTURAL Y ECONÓMICO.....</b>	<b>3</b>
<b>5.2.- HISTORIA DE LOS BIOCOMBUSTIBLES.....</b>	<b>3</b>
<b>5.3. QUÉ SON LOS BIOCOMBUSTIBLES.....</b>	<b>4</b>
<b>5.4.- CLASES DE BIOCOMBUSTIBLES.....</b>	<b>4</b>
<b>6.- MARCO TEÓRICO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....</b>	<b>5</b>
<b>6.1.- CONCEPTO Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....</b>	<b>5</b>
<b>6.1.1.- EFECTO CABTREE.....</b>	<b>5</b>
<b>6.1.2.- EFECTO PASTEUR.....</b>	<b>5</b>
<b>6.2.- ETANOL.....</b>	<b>6</b>
<b>6.3.- LEVADURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>7.- CONCEPTO DE BIORREFINERÍA.....</b>	<b>7</b>
<b>7.1.- BIOETANOL PRODUCIDO.....</b>	<b>7</b>
<b>7.1.1.- USOS.....</b>	<b>7</b>
<b>7.2.- MATERIAS PRIMAS.....</b>	<b>7</b>
<b>7.2.1.- EJEMPLO DE SUSTRATOS RESIDUALES Y NOVEDOSOS: EL LACTOSUERO.....</b>	<b>8</b>
<b>8.- PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.....</b>	<b>8</b>

<b>8.1.- PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE 1ª GENERACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>8.1.1.- ETAPAS.....</b>	<b>8</b>
<b>8.1.1.1.- CONFIGURACIONES DE LAS ETAPAS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>8.2.- PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE 2ª GENERACIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>8.2.1.- COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....</b>	<b>11</b>
<b>8.2.2.- PRETRATAMIENTOS DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....</b>	<b>14</b>
<b>8.2.2.1.- PRETRATAMIENTOS FÍSICOS.....</b>	<b>15</b>
<b>8.2.2.2.- PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS.....</b>	<b>15</b>
<b>8.2.2.3.- PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>8.2.2.4.- PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS.....</b>	<b>17</b>
<b>8.2.3.- FERMENTACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>9.- MEJORAS EN LOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>9.1.- <u>1ª MEJORA</u>: XUSE: <i>S. cerevisiae</i> fermentadora de xilosa.....</b>	<b>20</b>
<b>9.2.- <u>2ª MEJORA</u>: Identificación de enzimas lignocelulósicas para su expresión heteróloga en levaduras modelo para la obtención de un único microorganismo como bioerreactor.....</b>	<b>20</b>
<b>9.3.- <u>3ª MEJORA</u>: Identificación del ecosistema capaz de degradar la lignocelulosa para reproducir sus rutas metabólicas en levaduras modelo que sean capaces a su vez de fermentarlos en etanol .....</b>	<b>21</b>
<b>9.4.- <u>4ª MEJORA</u>: Introducción de genes y rutas metabólicas de otras bacterias y levaduras en <i>S. cerevisiae</i> para que sea capaz de fermentar pentosas y hexosas al mismo tiempo.....</b>	<b>21</b>
<b>10.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>21</b>
<b>11.- CONCLUSIONS.....</b>	<b>23</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>25</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>29</b>

<b>ANEXO 3.....</b>	<b>30</b>
<b>ANEXO 4.....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXO 5.....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXO 6.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO 7.....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXO 8.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO 9.....</b>	<b>38</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1 Gráfica de artículos depositados en Scopus cada año que contienen la palabra “bioethanol” obtenida.....</b>	<b>25</b>
<b>Ilustración 2 Gráfica de artículos depositados en PubMed cada año que contienen la palabra “bioethanol” obtenida.....</b>	<b>25</b>
<b>Ilustración 3 Principales autores que han depositado artículos relacionados con los procesos de obtención de bioetanol en la base de datos Scopus.....</b>	<b>26</b>
<b>Ilustración 4 Principales países en el campo de obtención de bioetanol en la base de datos Scopus.....</b>	<b>26</b>
<b>Ilustración 5 Principales universidades, institutos y centros de investigación con más artículos publicados en el campo de obtención de bioetanol en la base de datos Scopus.....</b>	<b>27</b>
<b>Ilustración 6 Tipos de documentos recogidos en esta base de datos Scopus relacionados con los procesos de obtención de bioetanol.....</b>	<b>27</b>
<b>Ilustración 7 Principales áreas de investigación a las que pertenecen los artículos publicados en el campo de obtención de bioetanol en la base de datos Scopus.....</b>	<b>28</b>
<b>Ilustración 8 Producción Mundial de Bioetanol, 2005-2017 en millones de galones.....</b>	<b>29</b>
<b>Ilustración 9 Gráfica de comparación entre la producción y comercio de bioetanol entre 2009 y 2026 en miles de millones de litros.....</b>	<b>29</b>
<b>Ilustración 10 Esquema del proceso de la fermentación alcohólica.....</b>	<b>30</b>
<b>Ilustración 11 Actividades de enzimas en cultivos de glucosa, hemicelulosa o celulosa preparados a partir de la fracción celular, sobrenadante, o lisados de cultivo completo.....</b>	<b>32</b>
<b>Ilustración 12 Aumento del consumo energético medido en millones de toneladas equivalentes de petróleo durante los años 1990-2011.....</b>	<b>37</b>
<b>Ilustración 13 Esquema simplificado de las etapas del proceso de obtención de bioetanol a partir de caña de azúcar.....</b>	<b>38</b>
<b>Ilustración 14: Esquema simplificado de las etapas del proceso de obtención de bioetanol a partir de maíz.....</b>	<b>38</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1 Características de las principales levaduras utilizadas durante el proceso de fermentación.....</b>	<b>22</b>
<b>Table 2 Characteristics of the main yeasts used during the fermentation process.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 3 Biorrefinerías destacadas para la obtención de combustibles de 2ª generación.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabla 4 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica mayoritariamente utilizados y sus principales parámetros y características.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 5 Variación en el costo de producción de bioetanol de 1ª generación de acuerdo con la fuente de carbono y materia prima utilizada en cada país.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 6 Consumo de Energía Primaria del año 2015 (representado en millones de barriles equivalentes de petróleo diarios.....</b>	<b>38</b>

## **1.- RESUMEN**

Ante la necesidad de la búsqueda de nuevas fuentes de energía alternativas que no se agoten y eviten la contaminación del planeta que producen los recursos fósiles actualmente utilizados, se plantea el uso de recursos alternativos como los biocombustibles. En esta revisión bibliográfica pretendemos proporcionar una visión general del proceso, así como de los aspectos relacionados con el mismo y los campos de investigación que están actualmente en activo para que obtener un mayor rendimiento de estos procesos energéticos. Centrándonos en el bioetanol, hemos expuesto los dos procesos principales de fermentación para su obtención. Además, también hemos expuesto los diferentes sustratos utilizados, así como las etapas de los procesos y los principales microorganismos utilizados en estos procesos. Se ha hecho hincapié en las principales ventajas de estos recursos energéticos y en las características diferentes al utilizar diferentes sustratos energéticos. A partir de esta información y, tras la comparación de gran cantidad de artículos, hemos determinado las combinaciones de microorganismos más importantes y las condiciones en las que se realiza cada etapa. Se exponen las características de los pretratamientos de la materia prima para que, en función del sustrato, determinar cuál es el más adecuado. También hemos expuesto algunos de los problemas que pueden ocurrir con el fin de aminorarlos, como es el caso de la obtención de productos de inhibición de las etapas de fermentación durante los pretratamientos. Por último, destacamos las principales líneas de investigación actualmente abiertas para mejorar esta producción, las cuales están centradas en dos aspectos principalmente: la fermentación simultánea de hexosas y pentosas por las levaduras utilizadas actualmente en la industria y la implementación de rutas degradadoras de los polímeros celulósicos en las mismas levaduras para poder obtener un proceso centralizado sin la necesidad de hacer varios cultivos de microorganismos diferentes.

## **2.- ABSTRACT**

Faced with the need to search for new alternative energy sources that do not run out and avoid pollution of the planet produced by currently used fossil resources, sources such as biofuels appear. Because of this, in this bibliographic review we intend to provide an overview of the process, as well as its related aspects and research fields that are currently active to obtain a higher performance from these energy processes. Focusing on bioethanol, we have exposed the two main processes from which bioethanol is obtained through fermentation. In addition, we have also exposed the different substrates used as well as the stages of the processes and the main microorganisms used in these processes. The main advantages of these energy resources and the different characteristics when using different energy substrates have been emphasized. From this information and after comparing a large number of articles, we have determined the most important combinations of microorganisms and the conditions under which each stage is carried out. The characteristics of the raw material pre-treatments are exposed so that depending on the substrate we can choose the one that is best. We have also exposed some of the problems that they may have in order to prevent them from appearing, such as obtaining inhibition products for the fermentation stages during pre-treatments. Finally, we highlight the main lines of research currently open to improve this production, which are mainly focused on two aspects: the simultaneous fermentation of hexoses and pentoses by the yeasts currently used in industry and the implementation of degraded routes of cellulosic sensors in the same yeasts to be able to obtain a centralized process without the need to make several cultures of different microorganisms.

### 3.- NECESIDAD DE HACER UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y OBJETIVO

La obtención de bioetanol mediante procesos de fermentación con levaduras se remonta muchos años atrás. En una primera búsqueda en Scopus con el término “bioethanol” encontramos el primer artículo relacionado con este proceso en 1981, que lleva por título “*Bioconversion of wheat straw to ethanol: Chemical modification, enzymatic hydrolysis, and fermentation*” de Detroy, R.W., Lindenfelser, L.A., Sommer, S. y Orton, W.L.. A fecha de 3 de Mayo de 2020, al realizar la búsqueda en Scopus, nos aparecen un total de 12.541 artículos diferentes que van desde 1981 hasta 2020. De este modo, tras analizar las principales palabras clave más utilizadas en estos artículos encontramos: “bioethanol” citada en 8,198, “ethanol” nombrada en 7,040 artículos, “fermentation” citada en 3,519 artículos, “biomass” nombrada en 2,797 artículos, “biofuel” citada en 2,599 artículos seguida de “Bioethanol production” en 2,403 artículos y “cellulose” que aparece en 2,090 artículos. Como muestran las principales palabras clave encontradas en estos artículos, el estudio principal está basado en la obtención de bioetanol a partir de biomasa mediante procesos de fermentación para su uso como biocombustible. Además el hecho de que aparezca la celulosa como palabra clave índice que uno de los sustratos más utilizados es el material lignocelulósico que contiene gran porcentaje de celulosa.

Por otro lado, cuando filtramos utilizando la palabra clave “yeast” nuestra búsqueda se reduce hasta 1,689 artículos, siendo la palabra clave relacionada con un tipo de microorganismos más citada en los artículos lo que implica que las levaduras son los principales productores de etanol. Además si en vez de filtrar por “yeast” utilizamos “*Saccharomyces cerevisiae*” encontramos un total de 1,495 artículos lo que claramente señala que *S. cerevisiae* es el principal microorganismo utilizado en estos procesos. A la vez, como se muestra en el Anexo 1, este tema ha cogido especial interés durante los últimos años. Como la información encontrada respecto a estos procesos es muy abundante y la extensión de tan breve de este trabajo, el objetivo principal de este TFG es realizar una extensa revisión bibliográfica para poder identificar y seleccionar la información más importante respecto a los diversos tipos de producción de etanol, comprendiendo tanto los de 1ª como los de 2ª generación, teniendo en cuenta los principales sustratos y las principales mejoras en las que se están trabajando actualmente para implementar y rentabilizar estos procesos.

### 4.- METODOLOGÍA

Con la intención de obtener una revisión bibliográfica lo más completa posible, procedimos a la realización de una búsqueda utilizando las principales palabras clave de cada apartado redactado (tanto en inglés como en español) en las bases de datos Alcorze, Google Scholar, Scopus, PubMed, ScienceDirect y Dialnet. También se utilizaron los apuntes de algunas asignaturas como Biotecnología del Medio Ambiente, Biotecnología Microbiana o Enología.

El primer paso que realizamos fue organizar los diferentes apartados en el que queríamos estructurar nuestro trabajo y realizar la búsqueda de información de estos apartados por separado. Tras la búsqueda, seleccionamos aquellas fuentes documentales más relevantes, teniendo en cuenta la cantidad así como la calidad. Entre ellas aparecen artículos de revistas, tesis doctorales, libros, documentos redactados por instituciones, etc.

Tras la selección de información, agrupamos las fuentes en los apartados e intentamos contrastar siempre estas informaciones en diferentes fuentes para comprobar que no haya contradicciones y que la información fuera en la misma dirección. Por último, se ha intentado redactar de la forma más clara y estructurada para definir bien las partes.



## **5.- INTRODUCCIÓN**

### **5.1.- CONTEXTO MEDIOAMBIENTAL, CULTURAL Y ECONÓMICO**

El inevitable crecimiento de la población mundial (previsto que supere los 9.700 millones de habitantes en 2050) (74) sumado al desarrollo de las tecnologías produce un gran incremento en el consumo de energía. Este consumo se prevé que en países desarrollados crezca hasta un 84% y que al menos un 30% de ella se cubra por fuentes renovables tales como los biocombustibles (1,6).

Este aumento en el consumo energético conduce, inexorablemente, al agotamiento de los recursos fósiles y fuentes de energía no renovables que junto a los efectos secundarios que estas fuentes provocan sobre la salud del planeta (emisión de gases efecto invernadero, contaminación atmosférica, vertidos, etc.) nos lleva a una búsqueda de nuevas fuentes energéticas alternativas que eviten la contaminación ambiental de las no renovables (2-5). Los biocombustibles son fuentes limpias, que reducen las emisiones de gases efecto invernadero y que pueden ayudar a eliminar otras fuentes de contaminación como son los residuos agrícolas (117). Además de ser fuentes inagotables y limpias, su uso también reduce los precios del petróleo ya que disminuye su demanda (1-3).

Ante el problema creciente de los recursos energéticos utilizados actualmente, la Unión Europea ha decidido intervenir y diseñar una política estratégica conjunta expuesta en la Directiva de Julio de 2009 (2009/28/CE), la cual indicó que para el año 2020 el 20% del consumo final de energía del conjunto de los Estados debería proceder de fuentes de carácter renovable y que al menos un 10% de este consumo energético renovable debería afectar al sector del transporte, por lo que los biocombustibles aparecen como un elemento esencial para lograr este reto y debido a ello muchos países están potenciando las investigaciones en este sector (5, 7,8). En la situación actual de energías renovables, España ocupa el cuarto puesto en el mercado mundial detrás de China, USA y Alemania, situándose los biocombustibles por detrás del uso de energía eólica y fotovoltaica, en tercera posición (72). El objetivo del PLANER entre 2011 y 2020 es que el 40% de la producción eléctrica sea renovable, planteándose como una realidad posible ya que en 2010 era el 39'6% (7).

### **5.2.- HISTORIA DE LOS BIOCOMBUSTIBLES (39)**

- Durante la primera mitad del siglo XX, algunos motores de vehículos ya funcionaban con etanol (Ford T etanol/gasolina o mezcla).
- En 1909 se fabricó el primer motor diésel que funcionaba con aceite vegetal (utilizando aceite de maní o cacahuete).
- En 1912, Rudolf Diesel dijo: “El uso de los aceites vegetales como combustibles en el motor puede parecer insignificante hoy, pero tales aceites pueden convertirse, con el curso del tiempo, en algo tan importante como el petróleo”.
- En 1920 los combustibles fósiles desplazan a los biocombustibles.
- En 1973 llega la crisis del petróleo por lo que se limita la producción y aumenta su precio.
- En 1975 Brasil inicia el programa “PROALCOOL”: que consiste en reducir la dependencia de los recursos fósiles. En Brasil el bioetanol se produce mayoritariamente a partir de la caña de azúcar, sin embargo en EEUU el sustrato mayoritario es el maíz.
- La producción de bioetanol ha aumentado desde 16.600 millones de litros en 2001 hasta 83.000 millones de litros en 2011. Sin embargo, para poder competir con el petróleo, se deben reducir los costes de producción y en este aspecto es de especial importancia el precio de la

materia prima ya que consiste en el 60% del precio final. Por ello se está centrando la investigación en nuevos cultivos y en la biomasa lignocelulósica.

En el Anexo 2 podemos encontrar las gráficas que representan la producción global de bioetanol y su tendencia con el paso del tiempo.

### 5.3.- QUÉ SON LOS BIOCOMBUSTIBLES

Su definición está especificada en el artículo 2 de la Directiva 2003/30/CE del Parlamento Europeo y el consejo, del 8 de mayo de 2003, relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte y se define “biocarburante” como “*el combustible líquido o gaseoso para transporte producido a partir de biomasa*”, entendiendo por “Biomasa” la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos procedentes de la agricultura (incluidas las sustancias de origen vegetal y de origen animal), de la silvicultura y de las industrias conexas, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y municipales. Por lo tanto, el origen de la biomasa utilizada como sustrato puede ser natural (de cultivos energéticos) así como residual (residuos forestales, agrícolas, de la industria agroalimentaria, urbanos, ganaderos, etc.)(8).

### 5.4.- CLASES DE BIOCOMBUSTIBLES

En función del tipo de biomasa utilizada tendremos diferentes categorías de biocombustibles expuestas a continuación (16, 130):

1. **COMBUSTIBLES DE 1ª GENERACIÓN:** Obtenidos a partir de cultivos como maíz, trigo, caña de azúcar, colza, cebada, o semillas oleaginosas. Utilizan una tecnología de conversión simple y de bajo costo, sin embargo, tienen un bajo rendimiento. El problema más importante que presenta su uso es la disyuntiva ética que provocan, ya que se necesitan utilizar campos de cultivos energéticos, lo que disminuye la disponibilidad de estos para el consumo en la alimentación y conduce a un encarecimiento de los alimentos y aumento de la pobreza) (9).
2. **COMBUSTIBLES DE 2ª GENERACIÓN:** Utilizan biomasa lignocelulósica como materia prima. Se obtiene a partir de subproductos como paja de cereal, bagazo de caña de azúcar, residuos forestales y desechos (componentes orgánicos de los desechos sólidos urbanos) entre otros. Esta es una de las ventajas de estos combustibles, ya que evitan la competición por la alimentación además de utilizar tierras no cultivables para algunos cultivos energéticos. Sin embargo, es necesario desarrollar pretratamientos costosos de la materia prima para obtener rentabilidad de los combustibles por lo que existen barreras biotecnológicas y los costes de producción son elevados por estos pretratamientos. Estos biocombustibles podrían llegar a aumentar la producción mundial de etanol actual más de 490 miles de millones de litros al año debido a la abundante variedad de materias primas (22, 71).
3. **COMBUSTIBLES DE 3ª GENERACIÓN:** Producidos a partir de cianobacterias o microalgas. Se pueden cultivar en lagunas poco profundas o tanques de alcantarillado, en tierras marginales o estanques cerrados durante todo el año, siempre que sean irradiadas con luz. Esto supone una ventaja ya que son muy fáciles de cultivar con una mayor tasa de crecimiento y evita la competición de los cereales por la comida. Tienen la versatilidad de cultivarse en agua tanto dulce como salada. Sin embargo, poseen un bajo contenido de lípidos, hay problemas de contaminación de biomasa en sistema de tanques abiertos, el coste

de los foto-biorreactores es elevado y se necesita un alto consumo de energía para el cultivo de las algas (121).

4. **COMBUSTIBLES DE 4ª GENERACIÓN:** Son los biocombustibles más recientes que se producen a partir de microorganismos (especialmente microalgas) modificados genéticamente. Como ventajas tienen un alto contenido en lípidos y producen un gran rendimiento, disminuyen el CO<sub>2</sub> del ambiente al aumentar su capacidad de captarlo y tener una alta tasa de producción. Sin embargo, se necesita una inversión inicial alta y la investigación se encuentra en su etapa inicial (34).

## **6.- MARCO TEÓRICO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

### **6.1.- CONCEPTO Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

La fermentación alcohólica se trata de un proceso catabólico de oxidación incompleta en el que una molécula orgánica (hidratos de carbono) es transformada en moléculas más simples (etanol + CO<sub>2</sub> + ATP) gracias a la acción de enzimas sintetizadas por microorganismos conocidos como catalizadores bioquímicos o biocatalizadores, sin necesidad de la utilización de oxígeno por lo que se trata de un proceso anaeróbico. Tiene como finalidad biológica la obtención de energía para los microorganismos (levaduras) que se encuentra en estado anaeróbico (ausencia de oxígeno) (124).

En el catabolismo de los azúcares, tras la glucólisis (única vía de obtención de ATP en ausencia de oxígeno), el piruvato no puede continuar hacia el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones. En su defecto, para regenerar el NAD<sup>+</sup> consumido durante la glucólisis, el piruvato es descarboxilado perdiendo un carbono en forma de CO<sub>2</sub> mediante la piruvato descarboxilasa. Se produce acetaldehído que será el aceptor de los electrones procedentes del NADH regenerando el NAD<sup>+</sup> para la glucólisis. Esta última reacción es catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa, obteniendo como producto etanol. Estas reacciones están ilustradas en el Anexo 3. El balance obtenido a partir de 1 molécula de glucosa son 2 moléculas de ATP, 2 moléculas de CO<sub>2</sub> y 2 moléculas de etanol (17).

Para la fermentación alcohólica en las levaduras es muy importante tener en cuenta 2 efectos del metabolismo que influirán en la producción y rendimiento de bioetanol: Efecto Pasteur y Efecto Crabtree.

#### **6.1.1.-EFECTO CRABTREE**

Descubierto por el bioquímico inglés Herbert Grace Crabtree describe que la fermentación aeróbica también ocurre en presencia de oxígeno. Esto es debido a que este fenómeno, todavía no comprendido exactamente ni caracterizado sus bases moleculares, consiste en que cuando en el exterior hay una concentración elevada de glucosa (>9 g/L), algunas levaduras facultativas (como *Saccharomyces cerevisiae*) son capaces de realizar la fermentación alcohólica en presencia de oxígeno en vez de realizar la respiración aeróbica. Esto es debido a que los elevados niveles de glucosa estimulan la glucólisis y la formación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato, lo que provoca que se reduzca la necesidad de obtener energía por el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa por lo que se obtiene una represión de la síntesis y de la actividad de las enzimas respiratorias. Esto implica que el piruvato formado se acumule y por tanto se favorezca su metabolización a etanol (42).

#### **6.1.2.-EFECTO PASTEUR**

Descubierto por Louis Pasteur en 1857 y es muy importante en el metabolismo de los azúcares ya que implica que en presencia de oxígeno, las levaduras facultativas realizan preferentemente la respiración aerobia para obtener energía, oxidando completamente la glucosa hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  por lo que la fermentación y producción de etanol es mínima. Esto es debido a que el transportador de membrana de azúcares tiene una mayor afinidad por la glucosa respecto al resto de hexosas y pentosas (118 y 120). El efecto Pasteur no inhibe el desarrollo de un efecto Crabtree en levaduras oxidativas (119).

## 6.2.- ETANOL

El etanol también, conocido como alcohol etílico, se trata de un alcohol que en las condiciones ambientales de presión y temperatura se presenta en estado líquido e incoloro. Es altamente inflamable y presenta una temperatura de ebullición de 78,4 °C. Es miscible en agua (a cualquier porcentaje) y al 96% en peso se forma una mezcla azeotrópica. Su fórmula química  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  y posee una masa molar de 46,07 g/mol. Cuando es obtenido a partir de procesos metabólicos de organismos es conocido como bioetanol; es actualmente la única alternativa a la gasolina que puede usarse de inmediato sin tener que realizar modificaciones significativas en la forma en la que se distribuye el combustible. El bioetanol se puede obtener por fermentación de plantas que contienen sacarosa (ej. remolacha, caña de azúcar) o almidón (ej. trigo, maíz). (121, 122 y 123)

## 6.3.- LEVADURAS

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares pertenecientes principalmente a la división Ascomycota de los hongos, reino Fungi. Son quimioorganoheterótrofos que usan como fuente de carbono y energía principal los azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa). La mayoría de ellos son anaerobios facultativos lo que implica que en condiciones anaerobias obtienen la energía mediante fermentación, sin embargo en presencia de oxígeno usan preferentemente la respiración aerobia ya que el balance energético obtenido así es mayor. Tienen una gran distribución en la naturaleza y su manipulación en el laboratorio es similar a las bacterias (42).

Son organismos ampliamente utilizados en la industria alimentaria (cerveza, pan, vino) y biotecnológica (enzimas, proteínas eucariotas, producción de biocombustibles).

El 96% de la producción industrial de etanol la realizan diferentes especies de levaduras por su alta productividad en la conversión de azúcares a etanol y su fácil separación después de la fermentación.

Entre las especies más utilizadas encontramos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces anamensis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida seudotropicalis*, *Candida bytyrii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis*, *Pichia membranaefaciens* y *Schizosaccharomyces pombe* (124).

Los sistemas biológicos discontinuos utilizados en la producción de etanol comienzan en aerobiosis durante el crecimiento exponencial del cultivo starter para obtener la máxima biomasa posible ya que si se empieza en condiciones anaerobias la biomasa obtenida no será lo suficientemente grande como para obtener una alta velocidad de conversión etanol. Por lo tanto encontramos dos fases diferenciadas en el cultivo de las levaduras (124):

- **Fase aerobia:** fase de crecimiento en la cual la glucosa pasa a dióxido de carbono.
- **Fase anaerobia:** fase de producción de etanol; la glucosa pasa a etanol y dióxido de carbono.

Sin embargo, incluso cuando las levaduras se encuentran en fase anaerobia es necesaria cierta presencia de oxígeno ya que es necesario para la producción de esteroides y ácidos grasos insaturados de membrana (124).

## 7.- CONCEPTO DE BIORREFINERÍA

En cuanto a la industria encargada de llevar a cabo el proceso de obtención de bioetanol, se trata de las biorrefinerías, industrias de refinado para la producción de energía, combustibles, materiales y productos químicos a partir de biomasa. Actualmente su objetivo principal es priorizar la obtención de energía (38). Encontramos las instalaciones separadas y el número de productos obtenidos es limitado. Aunque existen diferentes fases de biorrefinerías:

- **Fase I:** Biorrefinerías que únicamente utilizan un tipo de materia prima y obtienen un solo tipo de producto, por ejemplo a partir de caña de azúcar obtener únicamente bioetanol.
- **Fase II:** Biorrefinerías en las que a partir del uso de un solo tipo de materia prima, a través de múltiples procesos, obtienen variedad de productos.
- **Fase III:** Biorrefinerías integradas (76): industrias hacia las cuales se quiere progresar ya que tienen la capacidad de utilizar variedad de materias primas y mediante múltiples procesos obtienen variedad de productos. Se trata de instalaciones de carácter único en las que se aprovechan todas las fracciones de la biomasa y subproductos, para producir gran variedad de productos (48). Poseen 4 características:
  - Sistema integrado: se produce una completa conversión de la biomasa.
  - Flexibles: pueden utilizar biomásas de diferente naturaleza como sustrato.
  - Versátiles: utilizan múltiples procesos de transformación.
  - Obtención de una riqueza de productos de alto valor añadido.

En el Anexo 4 encontramos una tabla con las principales biorrefinerías actualmente activas en el mundo.

### 7.1.- BIOETANOL PRODUCIDO

Es alcohol etílico producido a partir de la fermentación de los azúcares de biomásas. Sin embargo, uno de los inconvenientes del etanol es su bajo potencial energético ya que 1 L de etanol solo permite recorrer en 70% de la distancia de un litro de gasolina.

#### 7.1.1.-USOS

Las aplicaciones como carburantes pueden ser: como combustible único, mezclado con gasolina en diferentes proporciones o como aditivo en gasolina (41, 77, 78, 73):

- ETBE: (Etil Ter-Butil Éter): aditivo para la gasolina. Síntesis química con bioetanol e isobutileno.
- Gasolinas oxigenadas: E5, E10 y E15 (5, 10 y 15% de etanol).
- Mezclas con alto contenido de etanol: E85, E95 y E100 → Vehículos de carburante flexible (FFVs, Flexible Fuel Vehicles).
- E-Diésel: aditivo para gasóleo (E3 y E15) → Facilita la combustión y reduce la contaminación ambiental.

### 7.2.- MATERIAS PRIMAS

Como materias primas utilizadas actualmente, en Brasil e India principalmente destaca la caña de azúcar a partir de la cual se produce directamente la fermentación. Sin embargo, en EEUU y Europa se utilizan materias primas muy ricas en almidón para lo cual, previamente a la fermentación, hay que

realizar una etapa de hidrólisis con amilasas. Las  $\alpha$ -amilasas rompen el almidón en fragmentos de pequeño tamaño (dextrinas) y las glucoamilasas liberan los monómeros de glucosa (19).

Además en EEUU también se utiliza maíz como materia prima, en Francia trigo, maíz y remolacha azucarera, en Alemania trigo y remolacha azucarera y en España trigo, cebada y maíz. Como el principal azúcar en estos vegetales es el almidón, hay que hidrolizarlo previamente por amilasas hasta conseguir pentosas y hexosas. Si se utilizan cultivos energéticos de estos vegetales como materia prima, el proceso es la hidrólisis, seguida de la fermentación y en último paso la destilación para purificar el etanol. La caña de azúcar está formada directamente por sacarosa por lo que no necesita la hidrólisis previa, ya que la sacarosa es un disacárido capaz de ser utilizado directamente por las levaduras (108).

En el Anexo 6 encontramos unas tablas con los datos de las principales materias primas utilizadas en cada país para la producción de bioetanol.

### **7.2.1.- EJEMPLO DE SUSTRATOS RESIDUALES Y NOVEDOSOS: EL LACTOSUERO**

Uno de los sustratos más novedosos utilizados es el lactosuero obtenido a partir de las industrias queseras. Durante la fabricación del queso, después de la formación de la cuajada y del trabajo de la cuajada (corte, cocción y agitación), en la etapa de desuerado, se produce la separación del cuajo (que posteriormente dará lugar al queso) del lactosuero. Este subproducto líquido tiene un gran porcentaje orgánico. Su componente mayoritario es el agua y contiene alrededor del 50% de sólidos de la leche. En el extracto seco encontramos un 66-77% de lactosa, 8-15% de varios tipos de lactoglobulinas y un 7-15% de sales minerales. Debido al alto porcentaje de lactosa, es un potencial sustrato para la fermentación alcohólica y así poder reducir la alta contaminación que provoca al ser vertido en aguas y suelos (49-51).

## **8.-PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

### **8.1.- PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE 1ª GENERACIÓN**

Para la producción de bioetanol, como sustrato se utilizan campos de cultivo de diversos vegetales como algunos cereales que podrían ser destinados a la alimentación. En estos cereales, diferenciamos las envolturas y la parte interna. En las envolturas encontramos el pericarpio, el mesocarpio y el endocarpio fundamentalmente formados por celulosa y hemicelulosa, minerales, proteínas y vitaminas mientras que en el interior encontramos varias capas (108):

- **Testa o tegmen:** cubierta con aceites y pigmentos que dan color al grano.
- **Aleurona o capa externa del endospermo:** (5-10% del total del grano) gránulos de grasa y proteína.
- **Endospermo o albumen:** contiene granos de almidón (85-90% del total del grano).
- **Germen o embrión:** en la parte inferior del endospermo, con proteínas, aceites y vitaminas (3% del total de grano).

Por lo tanto, lo que nos interesa es la parte del endospermo/albumen donde están los gránulos de almidón acumulado. A partir de esta información, los procesos para la obtención de bioetanol de primera generación a partir de los granos de cereal son los siguientes:

#### **8.1.1.- ETAPAS (113-116)**

1. **Acondicionamiento de la materia prima:** En el caso de España que se utilizan principalmente el trigo y la cebada, que al ser cereales, necesitamos un primer paso de molienda del grano para obtener una harina con un tamaño de partícula entre 3 a 6 mm. El objetivo de este proceso es facilitar la hidratación para posteriormente, facilitar la difusión y el acceso de las enzimas (22, 40).
2. A continuación se produce la **cocción:** mezclando la harina con agua nueva o backset (es decir, agua recirculada del proceso) en proporción 3:1 a altas temperaturas (40-60 °C a pH 4-6) para solubilizar los azúcares, formándose una mosto con elevada viscosidad (22, 40).
3. Luego se **añaden las enzimas (amilasas):** hidrolizan el almidón (amilosa y amilopectina) a dextrinas (19). También se añaden otras enzimas como proteasas, xilanasas, etc. Obteniendo un mosto con una densidad menor que contiene el almidón parcialmente hidrolizado (20-40% en peso de sólidos). La termoestabilidad de las enzimas es un parámetro muy importante a la hora de elegirlos por lo que es uno de los parámetros que podemos optimizar.
4. La siguiente etapa es la **licuefacción:** donde se produce una cocción con vapor a presión para romper todavía más el material y disgregarlo (se produce una rotura mecánica del grano). Se utiliza el sistema Jet Cooker en el cual el mosto es sometido en un sistema de vacío a una presión superior a 7 bares y a temperaturas mayores a 100°C (40). Se deja enfriar hasta los 85°C y se añade un cóctel enzimático con  $\alpha$ -amilasas que hidrolizan la amilosa que había persistido en oligosacáridos de menor peso molecular (dextrinas, maltosas, maltotriosas) (19, 22). También se incorporan xilanasas y malasas para la hidrólisis de los azúcares de la cobertura del grano.
5. A continuación llega la etapa de **sacarificación:** añadimos un cóctel enzimático rico en glucoamilasas para liberar los monómeros de azúcares de hexosas y pentosas. Para que las enzimas puedan tener una actividad óptima la temperatura debe estar entre 60-70°C y pH 5-6 .
6. El siguiente paso es la etapa de **fermentación:** la levadura utilizada mayoritariamente en este proceso es *Saccharomyces cerevisiae*. Para optimizar esta etapa debemos disminuir la temperatura hasta unos 32-37°C, que es la temperatura óptima de la levadura.
7. El último paso es la **destilación** del etanol para purificarlo. El mosto fermentado se envía a la unidad de destilación donde se separa una solución alcohol/agua de los sólidos sin hidrolizar. Tras el proceso de destilación se puede alcanzar un alcohol con valores superiores al 99'75% de pureza (22).

Los sólidos sin hidrolizar obtenidos como residuo se centrifugan para separarlos, obteniendo un parte líquida que se denomina vinaza y otra sólida, la torta:

- **La fracción líquida:** es rica en azúcares sin fermentar. Se recoge en tanques de almacenaje y suele tener 2 usos:
  - Se pueden recircular a la etapa de licuefacción
  - Dejar evaporar y fermentar para obtener un jarabe que es rico en proteínas procedentes del grano.

- La **fracción sólida** va a ser el principal constituyente de la ecoproteína. Se utiliza para la producción del pienso para ganado: se mezcla la ecoproteína con una parte del jarabe obtenido de la fracción líquida y se seca hasta que solo hay un 10% de humedad. A continuación se peletizan obteniendo pequeñas bolitas de pienso conocido como granos de destilación y así se obtiene la ecoproteína final que servirá como pienso para el ganado.

#### 8.1.1.1.- CONFIGURACIONES DE LAS ETAPAS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN

Respecto a la etapa de fermentación y sacarificación encontramos diferentes configuraciones posibles (66, 68, 69):

**1.- Fermentación en Co-cultivo (CF):** Consiste en cultivar en el mismo reactor de fermentación dos microorganismos, uno fermentador de glucosa y otro de pentosas, en etanol, reduciendo así los costos de inversión inicial. La mayoría de los estudios implican co-cultivos con dos levaduras: *S. cerevisiae* y *P. stipitis* (88). Sin embargo, esta estrategia tiene inconvenientes: la fermentación de la xilosa es más lenta que la de la glucosa y los microorganismos fermentadores de pentosas son fuertemente inhibidos por el etanol, por lo que cuando la concentración de etanol empieza a ser elevada durante la fermentación, irá inhibiendo estos microorganismos (24). Además, la glucosa reprime el catabolismo de la xilosa, es decir, mientras haya glucosa en el medio la xilosa no va a ser metabolizada ni fermentada. De hecho, cuando se utiliza una mezcla de azúcares en el cultivo, los microorganismos preferencialmente usan la glucosa. Para superar este problema se han aislado cepas de las especies *P. stipitis* o *C. shehatae* que sean incapaces de utilizar la glucosa. También existe competición entre ambas levaduras por el consumo de oxígeno (89-92).

**2.- Fermentación Secuencial (SF):** Consiste en realizar consecutivamente la fermentación de glucosa y xilosa en el mismo reactor. Para ello primero se fermentarían las pentosas por los microorganismos que después se inhibirían por las altas concentraciones de etanol, y se fermentarían las hexosas. Se han obtenido buenos resultados al utilizar una cepa mutante de *E.coli* incapaz de usar la xilosa durante la primera fase de crecimiento seguida por la fermentación de *S. cerevisiae* (110).

**3.- Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) (111):** Esta estrategia combina en un mismo reactor la hidrólisis enzimática y su consecutiva fermentación. Actualmente, se utiliza sólo la fermentación de la glucosa pero se espera que en el futuro se incluya la fermentación simultánea con pentosas, cuando se logre obtener cepas que fermenten ambos tipos de azúcares simultáneamente y de uso a escala industrial. Es decir, encontramos juntas las enzimas que añadimos o inmovilizamos en el reactor para la hidrólisis de los azúcares, así como las levaduras para la fermentación. La orientación de la co-fermentación coordinadamente a la hidrólisis de las fracciones celulósica y/o hemicelulósica comprende el proceso SSCF (sacarificación simultánea a la co-fermentación). Una de las ventajas es que una vez que los azúcares son liberados por la sacarificación, son fermentados inmediatamente, disminuyendo los riesgos de inhibición por productos finales de la hidrólisis (65). Esto conlleva tasas de conversión más altas, mayor rendimiento y concentración de etanol, todo ello sumado a una concentración de enzima necesaria menor. Además el costo del equipo también es menor (solamente se usa un reactor) y la presencia del etanol durante la hidrólisis disminuye el riesgo de contaminación. El mayor inconveniente es que las enzimas celulasas de la sacarificación poseen su actividad óptima a 50°C, mientras que la temperatura óptima para que las levaduras realicen la fermentación es menor o igual a 37°C. Actualmente, la principal vía de investigación se centra en las cepas termo-tolerantes,



algunas cepas de *S. cerevisiae* pueden crecer a 37°C así como algunas cepas de *S. pombe* son capaces de crecer a 41°C (130).

En todas las combinaciones en las que utilizamos co-cultivos formados por diferentes tipos de microorganismos que poseen diferentes parámetros óptimos (temperatura, pH, aireación, etc) debemos llevar a un consenso de los parámetros óptimos por lo que necesitamos aumentar los tiempos de la fermentación para obtener la misma producción. Como hemos aumentado los tiempos necesarios para estas etapas, es necesario controlar varios parámetros durante la fermentación alcohólica:

- a. Aireación
- b. Temperatura
- c. Agitación
- d. Evitar metabolitos no deseados que disminuyan el rendimiento de la producción.
- e. Regulación de las concentraciones de glucosa y de oxígeno: inicialmente se necesitan altas concentraciones oxígeno y bajas de glucosa para poder escalar el cultivo *starter* inicial ya que el oxígeno activa los procesos de respiración que se traducen en un incremento de la biomasa. Mientras que por el contrario, la carencia en el medio de oxígeno y el aumento de los niveles de glucosa desvían las rutas de obtención de energía para la levadura hacia los procesos de fermentación que producen principalmente etanol y CO<sub>2</sub>.

Todos ellos dependerán de los diferentes microorganismos utilizados en las combinaciones.

## **8.2.- PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE 2ª GENERACIÓN**

Como siguiente nivel en la producción de bioetanol encontramos el de 2ª generación. Los procesos utilizados para la obtención de estos combustibles se encarecen por el alto coste de almacenar y transportar la biomasa y el alto coste de los pretratamientos para convertir la biomasa en azúcar (pretratamientos térmicos e hidrólisis enzimática, que se incrementa por la necesidad de retirar la lignina).(9,10) Esto se ve empeorado por la naturaleza recalcitrante de la biomasa vegetal, el precio de los preparados comerciales, el difícil acceso de las enzimas a la biomasa, la baja actividad específica y eficiencia de las enzimas actualmente comercializadas, las lentas cinéticas, los bajos porcentajes de otros azúcares distintos a la celulosa y más accesibles y la necesidad de retirar la lignina ya que es insoluble en solventes e inaccesible al ataque enzimático (20).

El pretratamiento utilizado es la principal barrera en la producción de estas biocombustibles por lo que es uno de los principales objetivos de las investigaciones en el campo de la biotecnología para poder mejorar la producción y rendimiento del proceso. Estos pretratamientos están encaminados a desestructurar la pared vegetal y dejar accesibles los azúcares fermentables para que sea posible la despolimerización eficiente de los polisacáridos. Para ello se deben romper las uniones entre celulosa, hemicelulosa y lignina y/o modificación estructural de estos componentes. Para poder diseñar pretratamientos eficientes se debe conocer la estructura y componentes de la pared vegetal (52-55, 60-64):

### **8.2.1.-COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA**

La biomasa lignocelulósica es generalmente la parte no comestible de la materia vegetal, incluyendo residuos de cultivos de la mazorca de maíz, de la paja de trigo, residuos leñosos de la tala de bosques y la producción de papel, pastos de estación fría y cálida como hierba de pasto y festuca, y cultivos

como el sorgo. Entre las principales industrias de las que se obtiene esta biomasa residual encontramos: industrias aceiteras (orujo, alpechin y alperujo), conserveras (restos de vegetales y frutas, huesos, semillas y pieles), de vinos (hollejos y semillas de uva), de cereales y derivados, café y frutos secos (cáscaras), industrias ganaderas (purines), etc. (9-11)

La biomasa lignocelulósica consiste en una matriz cuya composición principal son ésteres extraíbles, proteínas, carbohidratos, celulosa, hemicelulosa, lignina y material mineral. Se trata de un heteropolímero complejo y es el componente estructural de las plantas, formado por la pared vegetal (lámina media, pared primaria y pared secundaria).

Sus 3 componentes mayoritarios son celulosa, hemicelulosa y lignina, que forman microfibrillas, las cuales a su vez se organizan en macrofibras que regulan la estabilidad de la pared vegetal.

La naturaleza recalcitrante de la lignina es lo que dificulta y actúa como barrera principal en el rendimiento de la biorrefinería (21). El contenido y la estructura de la lignina así como su entrecruzamiento son los principales factores limitantes en el aprovechamiento de esta biomasa por lo que mejoras en los pretratamientos que logren superar estas barreras supondrán un gran avance en el desarrollo de bioetanol como una fuente rentable energética.

Para poder diseñar pretratamientos de hidrólisis y entender sus mecanismos es necesario entender cómo se organiza la estructura de la pared vegetal y sus componentes (9-11):

- **Lámina media:** compone la capa de unión entre las células y fibrillas de la celulosa. Su componente principal es la lignina.
- **Pared primaria:** consta de dos fases: la matriz amorfa y la fase fibrilar. En cuanto a la primera está formada principalmente por hemicelulosa y polisacáridos no celulósicos, además también contiene proteínas estructurales y agua. Respecto a la fase fibrilar, su componente principal es la celulosa (entre un 8-25%).
- **Pared secundaria:** en esta estructura domina la fase fibrilar cuyo componente principal es la celulosa (60%) mientras que la matriz amorfa (30%) está compuesta principalmente por la hemicelulosa y la lignina.

Como podemos ver, dentro de las 3 estructuras principales que componen la biomasa lignocelulósica, destaca la presencia de 3 polímeros esenciales:

- **Celulosa:** es un polímero lineal de elevado peso molecular y un alto grado de polimerización. Constituyente mayoritario de las paredes celulares que proporciona fuerza y rigidez, evitando el hinchamiento y rotura. Biopolímero lineal cuya unidad estructural es el disacárido celobiosa que a su vez está formado por residuos de D-glucopiranosos unidos mediante un enlace  $\beta(1\rightarrow4)$ , es decir, es un polímero lineal de unidades de D-glucosa. En cuanto a su estructura, se organiza en fibrillas (cadenas de D-glucosa) las cuales se agrupan en grupos de 36 formando una microfibrilla (10-25 nanómetros). Las cuales se agrupan a su vez en conjuntos de 250 microfibrillas formando una macrofibrilla, las cuales también se agrupan en grupos de 15000 microfibrillas formando la fibra de celulosa. A su vez, identificamos zonas cristalinas y zonas amorfas (57-60).
  - En las **zonas cristalinas** las cadenas lineales se estabilizan mediante la formación de puentes de hidrógeno entre ellas, lo que permite que tengan una alta ordenación y le aporta las características de insolubilidad, rigidez y resistencia a la tracción y al ataque biológico y químico.

- Sin embargo, en algunas zonas del haz de microfibrillas se rompen los puentes de hidrógeno de las cadenas formando las **regiones amorfas**, las cuales se hidratan y permiten que ciertas enzimas ataquen y degradan la celulosa.

Comprende el 40% aproximadamente del total de la materia seca de la lignocelulosa con múltiples cadenas lineales del polisacárido. Está incrustado en una matriz resistente de hemicelulosa, y reforzada por múltiples puentes de hidrógeno entre sus cadenas. Las cadenas de celulosa/hemicelulosa están protegidas por la lignina y compuestos acetilados, unidos a la macroestructuras por enlaces covalentes (57-60).

**La cristalinidad de la celulosa y el grado de polimerización** es uno de los parámetros más importantes para la eficiencia de la hidrólisis ya que la estructura cristalina es menos susceptible para la degradación mediante enzimas y la cinética está altamente relacionada con el área accesible de la celulosa. (Por ejemplo, al reducir el tamaño de la partícula de la madera dura mixta pretratada con agua caliente de 3 mm a 2 mm, la conversión de la celulosa mejoró hasta un 50%). Además la celulosa con un bajo grado de polimerización posee más extremos reductores los cuales son susceptibles de ser hidrolizados en monómeros. El pretratamiento con alta carga enzimática es capaz de reducir la polimerización de la celulosa.

- **Hemicelulosas:** son heteropolisacáridos, es decir, polisacáridos formados por más de un tipo de monómero, es decir, diferentes pentosas (xilosa y arabinosa) así como hexosas (glucosa, manosa y galactosa) además de algunos compuestos fenólicos minoritarios (como por ejemplo el ácido ferúlico <4%). Estos polisacáridos cuentan con ramificaciones (principalmente xiloglucanos y arabinoxilanos) que impiden que se estructuren de forma ordenada teniendo así una naturaleza amorfa que junto con la lignina forma la matriz donde se incrustan las fibrillas de celulosa. Su grado de polimerización en condiciones naturales no excede los 200 monómeros. Su papel principal es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa para proporcionar rigidez a la pared celular, y son insolubles en agua. Entre dos cadenas de arabinoxilanos podemos encontrar una unión mediante acoplamiento oxidativo. Este acoplamiento está mediado por peroxidasas y peróxido de hidrógeno, que permiten la unión de los correspondientes polisacáridos a los que estos fenoles están esterificados, formando diferulatos, que tienen un papel estructural importante.

Es más susceptible a hidrolizarse que la celulosa. Sin embargo, protege principalmente la fibra de celulosa de los ataques enzimáticos. Uno de los objetivos principales del pretratamiento es solubilizar la hemicelulosa, su eliminación permite una mayor accesibilidad enzimática a la celulosa con poros de mayor volumen. Debido a que muchos de los polímeros de hemicelulosa se han unido por los grupos acetilo, se produce una obstaculización mayor de la enzima a la celulosa. En general, un pretratamiento químico ácido libera el grupo acetilo de la hemicelulosa que tiene interrelaciones en el esqueleto de xilano. Para minimizar las inhibiciones del grupo acetilo de la lignocelulosa, se propone el uso de ácido acético para la desacetilación con ácido acético. Las hemicelulosas en la pared secundaria también forman enlaces covalentes con la lignina.

Además también encontramos pectinas que son polisacáridos heterogéneos que contienen un alto porcentaje de ácidos galacturónicos. Son un grupo de polisacáridos con estructuras y

propiedades físico-químicas muy diversas que se encuentran en la pared celular y que junto a la celulosa y hemicelulosa aportan resistencia a la estructura vegetal.

- **Lignina:** (Comprende entre un 10% y un 30% de la biomasa) Se trata de un polímero aromático característico de plantas vasculares que protege a la celulosa en la pared secundaria y une las fibras a través de la lámina media. Debido a su composición y estructura, es altamente recalcitrante tanto al ataque químico como a la degradación biológica, y aporta impermeabilidad, resistencia, rigidez y protección frente a ataques. Es un compuesto muy importante y abundante en la estructura ya que el 20% del carbono fijado por las plantas en la fotosíntesis es destinado a la formación de este polímero, por lo que su biodegradación es fundamental para cerrar el ciclo del carbono en los ecosistemas terrestres (21).

En cuanto a su estructura, se trata de una macromolécula polifenólica que no tienen una única estructura. Su síntesis se realiza mediante la polimerización deshidrogenativa de tres alcoholes precursores: cumarílico, coniferílico y sinapílico. Su estructura está formada por tres tipos de unidades: siringilpropano, guayacilpropano y 4-hidroxifenilpropano. En los tipos de enlace entre unidades predominan enlaces éter y enlaces C-C. Normalmente los fenoles comprenden menos del 10% de la estructura. La dificultad de la degradación de la lignina radica en la gran complejidad estructural y en los diferentes tipos de enlace de la lignina.

Se encuentra en la lámina media y en las capas de la pared celular formando junto con la hemicelulosa una matriz alrededor de las microfibras de la celulosa (33).

Es uno de los componentes principales y durante su degradación puede liberar diversos subproductos inhibitorios, ya que algunos de sus compuestos derivados son de los inhibidores más influyentes en la reacción enzimática y en la fermentación microbiana, por lo que el proceso de eliminar la lignina (deslignificación) es importante para mejorar el rendimiento posterior de la fermentación. Además la lignina también puede inhibir directa o indirectamente la catálisis enzimática ya que las uniones no productivas de las celulasas y hemicelulasas a las moléculas de lignina disminuyen notablemente su actividad catalítica, debido a las interacciones hidrofóbicas lignina-enzima. Se ha detectado que la lignina que ha sido pre-tratada y por lo tanto tiene una estructura condensada heterogénea, afecta más severamente a la celulasa que la lignina aislada de la biomasa no tratada (35).

- También encontramos otros **compuestos minoritarios**: encontramos una amplia variedad de compuestos de bajo peso molecular y pueden ser clasificados en extraíbles hidrofílicos que se pueden extraer con agua, extraíbles hidrofílicos que se pueden extraer con disolventes orgánicos (compuestos no volátiles como grasas, fitoesteroides, etc.) y además encontramos las proteínas y cenizas (carbonatos, oxalatos, sílice y metales).

## 8.2.2.- PRETATAMIENTOS DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Para que las levaduras sean capaces de utilizar estas materias como sustratos de fermentación, se necesita una hidrólisis previa de los polímeros ya que utilizan únicamente los monómeros de azúcares como sustratos. Por lo tanto, previa a la etapa de fermentación es necesario realizar una etapa de hidrólisis de los polisacáridos conocida como sacarificación. Pero para poder obtener estos polímeros accesibles a las enzimas de sacarificación, se necesita pre-tratar la biomasa lignocelulósica.

En respuesta a la recalcitrancia de la biomasa lignocelulósica, se han estudiado procesos de pretratamiento para descomponer la estructura intrincada de la macroestructura de la planta, y así los polisacáridos expuestos puedan liberarse en azúcares monoméricos siguiendo el paso de hidrólisis con ácidos, bases o enzimas. Esta naturaleza recalcitrante, así como el rendimiento de la sacarificación están relacionadas con la cristalinidad de la celulosa, su grado de polimerización, el contenido en lignina y las áreas de superficie (porosidad). Los objetivos y factores principales que tienen los pretratamientos de la biomasa son disminuir la cristalización y aumentar el área de superficie de la celulosa para la digestión enzimática, solubilizar la hemicelulosa y/o lignina, evitar la pérdida de azúcares, minimizar la formación de inhibidores indeseables derivados de la lignocelulosa y minimizar los costos de energía capital.

Una de las primeras biorrefinerías que ha empezado a utilizar biomasa lignocelulósica como materia prima está en Abengoa, Kansas. Se trata de la primera planta que da uso comercial a esta tecnología. Utiliza biomasa residual, excedente de retirar los granos de las cosechas, es decir, residuos agrícolas no comestibles como tallos y hojas que no compiten con el grano destinado a alimentación. Tiene una capacidad para generar 95 millones de litros al año. También puede utilizar los sólidos de la biomasa residual procedente del proceso de conversión de etanol. La planta genera 21 megavatios de electricidad, cantidad suficiente para abastecerse a sí misma y enviar excedente de energía limpia y renovable a la comunidad local del Condado de Stevens. (12,14)

Respecto a la eficiencia de los pretratamientos depende de (109):

- Sustrato altamente digerible: mejorar la formación de azúcares o la capacidad para producirlos en la posterior etapa de hidrólisis.
- Evitar la degradación o pérdida de carbohidratos.
- Evitar la formación de subproductos que pudieran tener un efecto inhibitorio en los posteriores procesos de hidrólisis y fermentación.

Los diferentes métodos de pretratamientos se clasifican en: físicos, químicos, físico-químicos y biológicos. Las instalaciones seleccionan el más adecuado en función de las materias primas y las instalaciones de las que disponen (105-103). El Anexo 5 explica detalladamente los pretratamientos más utilizados.

#### **8.2.2.1- PRETATAMIENTOS FÍSICOS**

Consisten en la reducción del tamaño de la partícula de la materia prima a través de procesos de molienda, triturado y astillado. Es una etapa inicial que facilita una mayor digestibilidad al disminuir el grado de cristalinidad y polimerización. Sin embargo, incrementa los costes porque tienen un requerimiento energético añadido.

- **Fragmentación mecánica y pirolisis:** reduce la cristalinidad de la celulosa.
- **Pirolisis por impulsos de campo eléctrico:** obtenemos productos gaseosos y líquidos en condiciones ambientales, altera las células vegetales y requiere un equipamiento simple.

#### **8.2.2.2.- PRETATAMIENTOS QUÍMICOS**

Degeneran la estructura de la lignina, rompiendo los enlaces de lignina-carbono. Una desventaja es que se generan subproductos que pueden inhibir etapas posteriores y afectar negativamente al rendimiento global del proceso (ej. Fenol de la lignina, furfural) (123).

- **Hidrólisis ácida:** hidroliza la hemicelulosa a xilosa y otros azúcares y altera la estructura de la lignina. Es importante porque solubiliza la hemicelulosa. Se utilizan ácidos diluidos ya que tienen un menor impacto medioambiental y su coste es menor. Suelen ser orgánicos como málico y nítrico, y se utilizan sobretudo el clorhídrico y el sulfúrico, pero depende de la industria. Normalmente para esta hidrólisis se necesita una temperatura elevada, alrededor de 180°C a tiempos cortos. También se pueden utilizar tratamientos a temperaturas más bajas (90-120°C) a tiempos comprendidos entre 30 minutos y 24 horas (30).
- **Hidrólisis alcalina:** elimina la hemicelulosa y la lignina, y aumenta la superficie de acceso. Los más utilizados son el hidróxido sódico y el amoníaco que rompen los enlaces entre la lignina y la hemicelulosa. Se utiliza principalmente para residuos de la madera, no en residuos de herbáceas. Su principal desventaja es que se degrada la hemicelulosa y que genera subproductos que pueden inhibir las etapas posteriores y afectar negativamente al rendimiento global, como son el fenol procedente de la lignina, el ácido acético, el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (pentosas y hexosas).
- **Organosolventes (hidrólisis con solventes orgánicos):** hidroliza la lignina y la hemicelulosa.
- **Ozonólisis (hidrólisis con ozono):** reduce el contenido de lignina y no produce residuos tóxicos.

Con estos dos últimos tratamientos no se producen inhibidores porque son mucho menos agresivos pero esto implica a su vez que los rendimientos sean menores. Se realizan a temperaturas ambientales. Estos métodos químicos se suelen combinar con altas presiones y cierta humedad que hidrate la biomasa una vez molida.

### 8.2.2.3- PRETATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

Solubilizan la lignina y hemicelulosa alterando y disminuyendo la rigidez característica de la biomasa. También se liberan fenoles, alcohol vainillínico, furfural e hidroxifurfural que inhiben la fermentación. Si se utilizan temperaturas entre 150 y 180°C se rompen las uniones entre lignina y hemicelulosa. A temperaturas ligeramente mayores se produce la liberación de acético que actúa como catalizador de la solubilización total o parcial de la hemicelulosa. Sin embargo, a temperaturas superiores a 250°C se liberan fenoles, alcohol vainillínico, furfural e hidroxifurfural que son inhibidores de la fermentación (43).

- **Explosión de vapor (Steam explosion):** degrada la hemicelulosa y transforma la lignina. Se utiliza vapor de agua o ácido sulfúrico diluido a alta presión: 20-50 bares, 210-290°C, 1-5 minutos. Desestructura el material permitiendo una alta recuperación de azúcares y un aumento muy significativo de la digestibilidad de la celulosa. Pero descompone parcialmente la celulosa y genera inhibidores. Produce un efecto de combinación de alteraciones físicas (degradación y ruptura de fibras) y químicas (despolimerización y rotura de enlaces). El material desestructurado que se obtiene se denomina slurry y puede ser hidrolizado a azúcares fermentables por acción de celulasas y hemicelulasas. Es uno de los métodos más utilizados (106).
- **Explosión por vapor con amoníaco:** Aumenta la superficie de acceso y no forma compuestos inhibidores para las etapas posteriores. Se trata de una variante del método

anterior y es efectivo con material herbáceo y pastos. Rompe enlaces lignina-carbohidratos logrando convertir hasta un 90% de la celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables.

- **Aguas calientes en fase líquida:** se humedece la paja con agua caliente y se somete a presión durante tiempos mayores. Solubiliza la hemicelulosa sin la formación de inhibidores. Para este pre-tratamiento no es necesario la molienda ya que en la cocción se fragmenta la biomasa. Es empleado para sustratos herbáceos.
- **Explosión con CO<sub>2</sub>:** Reduce el contenido de lignina y no produce residuos tóxicos.

#### 8.2.2.4- PRETATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Biotratamiento del material lignocelulósico:

- **Enzimática:** degrada la lignina y la hemicelulosa aunque de forma lenta. Se pueden incorporar directamente cócteles enzimáticos o que estén inmovilizados en los reactores en condiciones adecuadas (29, 75).
- **Microbiológicos:** se cultivan los hongos en condiciones de “fermentación en estado sólido”, en presencia de agua libre que es necesaria para el crecimiento y metabolismo celular sin exceder la capacidad máxima de retención de los sustratos. Se deben optimizar y controlar los rendimientos del proceso, para ello hay que controlar una serie de parámetros (37):
  - Concentración de biomasa fúngica en el inóculo.
  - Contenido en humedad.
  - Tamaño de partícula del sustrato.
  - Presencia de iones que faciliten la degradación.
  - Temperatura.
  - Aireación de los cultivos.

Estos pretratamientos presentan problemas de escalado, lento crecimiento de los hongos sobre la biomasa y consumo indeseable de polisacáridos (reduce el rendimiento de recuperación de azúcares fermentables). Las ventajas es que no requieren compuestos químicos ni energía y no se generan inhibidores (37).

Encontramos diferentes combinaciones de organismos que poseen complejos enzimáticos que trabajan sinérgicamente para degradar todos los polisacáridos de la pared vegetal. Por ejemplo, entre los organismos capaces de degradar la celulosa, aparecen bacterias anaeróbicas, algunas bacterias celulolíticas son: *Cellulomonas*, *Thermobifida* y *Clostridium*, que producen enzimas termoestables y poseen celulosomas. Los celulosomas son complejos multienzimáticos asociados a las células que poseen las enzimas capaces de degradar los polímeros. Estos complejos poseen diferentes tipos de dockerinas como las de tipo I que se unen a las subunidades catalíticas e interactúan con otras proteínas de estos complejos llamadas cohesinas formando así el andamio del complejo supramolecular. Además, el celulosoma está unido a la superficie celular mediante la interacción de las dockerinas tipo II con las cohesinas tipo II (12, 14). También encontramos especies aeróbicas que habitan en los suelos capaces de degradar la celulosa, como es el caso de *Streptomyces* y los hongos basidomicetos, de hecho, las celulasas producidas por los hongos se comercializan actualmente. Entre ellas encontramos algunos géneros como *Phanerochaete*, *Fusarium* y *Trichoderma*, y algunas especies como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Shizophyllum*. Las ventajas de estos microorganismos es que

tienen altos niveles de expresión de enzimas extracelulares que secretan al medio. Actualmente, se está utilizando la expresión heteróloga de las enzimas de estos microorganismos en *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Destacamos las celulasas fúngicas que son enzimas solubles extracelulares con acción sinérgica de exo/endoglucanasas. Dentro de las endoglucanasas destacamos la 1,4-β-D-glucan glucanohidrolasas, que cortan al azar en las regiones amorfas en el interior del polisacárido generando oligosacáridos de diferentes tamaños. En cuanto a las exocelulasas, encontramos diferentes tipos en función de qué monómeros se liberan tras el corte de la enzima: por ejemplo la enzima 1,4-β-D-glucan glucanohidrolasas también actúa como exoglucanasa y libera monómeros de glucosa. Por el contrario, las enzimas 1,4-β-D-glucan celobiohidrolasas liberan unidades de celobiosa. También aparecen las β-glucosidasas, como las β-D-glucóxido glucohidrolasas, capaces de hidrolizar la celobiosa liberando unidades de glucosa. Por último encontramos las enzimas LPMOs que tienen un papel importante y crucial, ya que son monooxigenasas que actúan en las zonas cristalinas de la celulosa. La expresión de estas enzimas está controlada mediante la fuente de carbono, tal como se muestra en un estudio (125) acerca de la expresión de enzimas despolimerizantes en diferentes sustratos como celulosa y hemicelulosa. Como se indica en el Anexo 7, podemos identificar diferentes perfiles de expresión de combinaciones enzimáticas en función de la fuente principal de carbono sobre la crecen los microorganismos, ya que la fuente de carbono condiciona la expresión enzimas diferentes (80-86).

En cuanto a la hemicelulosa, destacan los géneros de *Escherichia*, *Pichia*, *Zymomonas*, *Thermoanaerobacter* y *Streptomyces*. Entre las enzimas más importantes en la degradación de la hemicelulosa podemos encontrar: la endo-β-D-xilanasas (rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula), la arabinofuranosidasa (hidroliza las cadenas laterales de la arabinosa), las acetil xilan esterasas (rompen grupos acetatos), la glucoronidasa (liberan unidades de ácido glucorónico a partir de unidades de xilosa), las β-xilosidasas (enzimas activas sobre oligosacáridos cortos produciendo xilosa) y las β-glucosidasas (producen xiloglucano) (80-86).

Por último, respecto a la lignina, es el polímero más difícil de degradar por tres factores: su naturaleza no fenólica, el entramado molecular que dificulta el acceso de las enzimas y la heterogeneidad del polímero. Para lograr con éxito su degradación, los hongos ligninolíticos han desarrollado diferentes estrategias: enzimas extracelulares, residuos catalíticos expuestos en su superficie, enzimas inespecíficas y mediadores redox naturales que son transportadores de electrones difusibles. Los basidomicetos, por ejemplo, son una alternativa sostenible a procesos industriales para la obtención de fibras de celulosa (18).

En la biodegradación de la lignina encontramos 2 grupos bien diferenciados: los hongos de podredumbre blanca (como *Pleurotus eryngii* y *Phanerochate chrysosporium*, los cuales degradan selectivamente la lignina y la hemicelulosa) y los hongos de podredumbre parda (como *Postia placenta*, degradan los polisacáridos de la pared celular modificando parcialmente de la lignina) (102). En cuanto a los hongos de podredumbre blanca, la degradación de la lignina está basada en lacasas, oxidasas productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peroxidasas que utilizan este H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como co-sustrato. Como mediadores utilizan iones metálicos, radicales aromáticos y radicales de oxígeno. En cuanto a los hongos de podredumbre parda, utilizan reductasas que liberan Fe<sup>2+</sup> y oxidasas que liberan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La degradación de la lignocelulosa se produce principalmente por lacasas y el radical hidroxilo producido en la reacción de Fenton en la que está implicada el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} + \text{OH}\cdot$  (18, 80-86).

De estos tipos de tratamientos, tanto físicos, químicos y físico-químicos se utilizan a escala industrial mientras que los biológicos todavía no.



### 8.2.3.- FERMENTACIÓN

Respecto a esta etapa, generalmente la realiza *Saccharomyces cerevisiae* pero además, como la hemicelulosa contiene pentosas, estas son fermentadas por bacterias entéricas (*Escherichia coli* y *Klebsiella oxytoca*) y por otras levaduras (*Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *Pichia stipitis*). Se pueden utilizar estos microorganismos pero actualmente existen varios problemas con su uso, ya que se inhiben a concentraciones más bajas de etanol que *Saccharomyces* cuando se produce la fermentación. Son de crecimiento más lento y mucho más sensibles a los compuestos inhibidores liberados durante los pretratamientos. Se puede realizar con diferentes combinaciones: teniendo la fermentación de hexosas y pentosas en tanques separados, en un mismo tanque o en un proceso integrado en el que las enzimas celulasas y xilanasas sean producidas por microorganismos presentes en el propio tanque. Se tiende a una configuración integrada para disminuir costes y para aprovechar mejor el sustrato (44, 45).

Hay 3 configuraciones posibles (76):

- **1ª Configuración:** Se asemeja a la fermentación secuencial vista en la obtención de bioetanol de 1º generación. Tras el pre-tratamiento de la biomasa (celulosa + hemicelulosa + lignina) obtenemos una fracción sólida (celulosa + lignina) y una fracción líquida (pentosas + inhibidores). Cada una de las fracciones es conducida a tanques separados. La fracción sólida primero sufre una hidrólisis de la celulosa y a continuación la fermentación de las hexosas. La fracción líquida pasa directamente a un tanque de fermentación de las pentosas. A continuación se mezclan ambas fracciones y se destilan obteniendo etanol con elevado grado de pureza y lignina que deberá sufrir un tratamiento de efluentes antes de ser vertida.
- **2ª Configuración:** Es similar a la fermentación en co-cultivo que hemos visto en la obtención de bioetanol de 1ª generación. En esta configuración las fracciones no son separadas sino que simplemente se juntan, pasan por una previa hidrólisis de la celulosa y a continuación en un tanque se fermentan tanto pentosas como hexosas a la vez. Para ello hay que potenciar el crecimiento de las levaduras metabolizadoras de pentosas (*Sps*, *Scheffersomyces*, *Pichia*) en las fases iniciales de la fermentación. También se utilizan mutantes de *S. cerevisiae* con crecimiento más lento u organismos recombinantes fermentadores de pentosas y hexosas (como algunas cepas de *E. coli*, *Zymomonas sp.* y *S. cerevisiae*) (46, 97-101).
- **3ª Configuración: Bio-proceso Consolidado (CBP):** Es la estrategia considerada como más eficiente, donde la producción de celulasas, la hidrólisis de la celulosa y la co-fermentación de las pentosas y hexosas se realizan simultáneamente. Para ello es necesario desarrollar, por técnicas de biología molecular, un microorganismo capaz de producir celulasas y altas concentraciones de etanol a partir de pentosas y hexosas. Como cepas de partida para estudiar esta configuración se utilizan microorganismos naturalmente celulolíticos, siendo los anaeróbicos de especial interés. Dentro de las bacterias encontramos *Clostridium Thermocellum* (una vez es incrementada su capacidad de producción de etanol), ya que en comparación a otras bacterias termofílicas produce menos subproductos. Obtiene etanol en altas concentraciones de sustrato y es adecuado para aplicaciones a gran escala pero su gran desventaja es que es incapaz de fermentar pentosas, uno de los objetivos deseados (46).

## 9 - MEJORAS EN LOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN:

### **9.1.- 1ª MEJORA: XUSE: *S. cerevisiae* Fermentadora De Xilosa**

Las levaduras *S. cerevisiae* no son capaces de fermentar pentosas, sin embargo, la xilosa es uno de los azúcares más abundantes en la materia lignocelulósica por lo que su fermentación es crucial para poder obtener un buen rendimiento de la biomasa y revalorizarla. Por lo tanto, una de las vías de estudio principales es obtener cepas de esta especie que sean capaces de fermentar la xilosa con un alto rendimiento. Una de las cepas conseguidas capaces de fermentar también xilosa es la conocida como XUSE (27, 36, 47).

Esta cepa fue desarrollada mediante mutación dirigida con CRISPR-Cas9 seguida de evolución dirigida. Para ello, previamente se introdujeron los genes mutantes de la xilosa isomerasa, xilulocinasa e introduciendo una copia adicional de los genes mutantes de la xilosa isomerasa y transaldolasa. Así se genera la cepa modificada racionalmente (XUS) y posteriormente se aplica la ingeniería evolutiva subcultivando esta cepa y seleccionando las colonias de mayor tamaño y llevándolas a continuación a condiciones de fermentación para comprobar su fenotipo de alto rendimiento (27).

Se consiguió obtener una cepa capaz de convertir la xilosa a etanol con un rendimiento de 0,43 g de etanol/ g de xilosa. Adicionalmente se exhibió la fermentación simultánea de glucosa y xilosa con una inhibición insignificante de la glucosa (27).

### **9.2.- 2ª MEJORA: Identificación de enzimas lignocelulósicas para su expresión heteróloga en levaduras modelo para la obtención de un único microorganismo como biorreactor**

Existen bacterias capaces de fermentar biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustibles. Es el caso de *Clostridium phytofermentans* que fermenta sustratos celulósicos de materias primas no comestibles. Secreta enzimas para despolimerizar la biomasa y obtener azúcares libres reductores además de enzimas para fermentarlos obteniendo bioetanol. Es una de las grandes ventajas que ofrece este microorganismo, ya que a diferencia de otros clostridios, no necesita del celulosoma donde están ancladas todas estas enzimas. Se estudia *C. phytofermentans* para diseñar microorganismos capaces de vencer el carácter recalcitrante de la materia lignocelulósica que es el principal inconveniente de estos biocombustibles (13, 15, 23).

Para ello analizan el crecimiento y la fermentación en diferentes polímeros celulósicos, cuantificando los cambios en el proteoma que permitirían la fermentación en cada sustrato y diseñan un modelo de fermentación celulósica mostrando las enzimas clave que pueden ser expresadas de forma heteróloga en otros hospedadores para optimizar potencialmente los biocombustibles celulósicos.

En su genoma se encuentran 161 enzimas activas en carbohidratos incluidas 108 glucosidasas para digerir diferentes tipos de biomasa. Cuantificaron 2567 proteínas en los diferentes tratamientos, que representan el 65% del proteoma en las que identificaron las diferentes combinaciones de carbohidratasas utilizadas para degradar la celulosa y la hemicelulosa, así como enzimas glicolíticas y alcohol deshidrogenasas (ADH) que permiten la producción de etanol a rendimientos casi máximos (32).

*C. phytofermentans* crece rápido en hemicelulosa pero produce relativamente más acetato que etanol ya que tiene una absorción más rápida de los xilosacáridos por los transportadores de alta afinidad y una alta expresión de acetato kinasa, que podría ser inactivada para aumentar el rendimiento de etanol sobre sustratos ricos en hemicelulosa.

Gracias a este estudio identificaron las enzimas más altamente reguladas y secretadas, priorizando targets para una bioconversión más eficiente de diferentes tipos de biomasa. Esta alta eficiencia en la fermentación también sugiere que la expresión heteróloga de enzimas glicolíticas alternativas y múltiples ADHs de *C. phermentans* podrían mejorar el rendimiento en etanol en otros microorganismos (13, 15).

### **9.3.- 3ª MEJORA: Identificación del ecosistema capaz de degradar la lignocelulosa para reproducir sus rutas metabólicas en levaduras modelo que sean capaces a su vez de fermentar en etanol (28).**

Uno de los mayores problemas es la digestión de la masa lignocelulósica. Sin embargo, hay organismos que se alimentan de madera como las termitas que han desarrollado un sistema lignocelulolítico natural eficiente con la ayuda de simbiosis microbianos intestinales especializados.

Los datos metagenómicos de *Nasutitermes corniger*, obtenidos del portal de repositorio de metagenomas IMG / M (JGI), han sido analizados para identificar comunidades microbianas en diferentes segmentos intestinales e idear una red de interacción metabólica a nivel de especie del microbioma intestinal de termitas para tener una comprensión a nivel del sistema de la comunicación metabólica. Se desarrolló una red integral de alimentación metabólica cruzada de 205 microbios y 265 metabolitos utilizando datos experimentales publicados (25).

Gracias a este análisis, varias hidrolasas de glucósidos con sus productores microbianos correspondientes en el intestino de termitas proporcionarán información para desarrollar un sistema de biorreactor de lignocelulosa basado en co-cultivo. El cóctel enzimático obtenido de la red de degradación de la lignocelulosa también puede ayudar a optimizar el paso de escarificación enzimática en el proceso de producción comercial de biocombustibles (25, 26).

### **9.4.- 4ª MEJORA: Introducción de genes y rutas metabólicas de otras bacterias y levaduras en *S. cerevisiae* para que sea capaz de fermentar pentosas y hexosas al mismo tiempo (31).**

Al igual que se introducían genes de otros microorganismos para que *Saccharomyces* pueda realizar la sacarificación, se hace lo mismo con los genes de enzimas capaces de fermentar pentosas con buen rendimiento (26).

Para ello se produce la expresión de la ruta de conversión de D-xilosa a D xilulosa que es realizado por una xilosa isomerasa heteróloga bacteriana (XYLA). Una segunda ruta para el catabolismo de la xilosa, que implica una xilosa reductasa y una xilitol deshidrogenasa, ha sido encontrada en ciertas levaduras (*P. stipitis*) y hongos. Su introducción en *S. cerevisiae* le permite consumir xilosa (13, 23).

En cuanto a la arabinosa, las rutas bacterianas y de hongos que comprenden su catabolismo, existen en la naturaleza y ambas rutas han sido independientemente expresadas en *S. cerevisiae*. Cepas recombinantes con rutas fúngicas heterólogas y bacterianas (*Lactobacillus plantarum*), las levaduras producían etanol con rendimiento de 0.43 g/ g CH consumido, y especificidad de producción de etanol en un ratio de 0.29 g/g/h (13).

## **10.- CONCLUSIONES**

Concluida la revisión bibliográfica, debemos destacar varios aspectos. Primero de todo, el principal interés actual en el desarrollo de biocombustibles como fuente alternativa de energía que tiene un

crecimiento claramente exponencial. A su vez, la mayoría de los artículos estaban de acuerdo en las características de cada generación de biocombustibles así como en los sustratos utilizados en cada una de ellas. Respecto a las etapas de cada proceso, están claramente definidas y citadas en la mayoría de los artículos que relataban los procesos. Sin embargo, las condiciones de fermentación están muy lejos de estar definidas. Apenas algún artículo muestra datos respecto a los procesos de temperaturas, pH o tiempos. En los que encontrábamos algún dato de este tipo se trataban de intervalos bastante amplios por lo que no se han identificado parámetros exactos óptimos.

La principal causa de esta inexistencia de datos exactos de los parámetros utilizados en estos procesos se debe a la alta influencia del tipo de microorganismos y cepas utilizados. Cada cepa de levadura posee un pH y una temperatura de actividad catalítica óptimos, así como diferentes concentraciones de cada producto, subproducto y sustrato afecta de manera diferente a cada levadura utilizada. A su vez, como se está intentado obtener levaduras con mejoradas para la eficiencia, la mayoría de las cepas utilizadas actualmente han sufrido procesos de mutación, ya sea mediante mutación espontánea o dirigida, lo cual modifica siempre los valores óptimos de temperatura, pH y demás parámetros, por lo que causa que exista muy poca uniformidad acerca de estos parámetros. Además a esto hay que añadirle el hecho de que para implementar los procesos de fermentación se están utilizando co-cultivos de diferentes levaduras o microorganismos para conseguir una buena fermentación simultánea de pentosas y hexosas y, por lo tanto, los valores de estos parámetros varían en función de las combinaciones utilizadas, lo cual es muy poco uniforme en los artículos consultados. A continuación en las tablas se muestran los valores recogidos para que la actividad metabólica de las principales levaduras utilizadas en los procesos de fermentación para la obtención de bioetanol.

**Tabla 1.-** Características de las principales levaduras utilizadas durante el proceso de fermentación.

**Fuente:** Elaboración propia (124-129, 70).

Levadura	Sustrato	Temperatura	pH	Características
<i>Pichia stipitis</i>	Xilosa	26 - 35 °C	4 – 7 pH óptimo = 6	Baja tolerancia a etanol (<5%). Necesidad de ajuste de la aeración. Muy sensibles a los inhibidores presentes en el hidrolizado (el ácido acético)
<i>Candida shehatae</i>	Xilosa	25 - 32 °C	3'5 – 7 pH óptimo = 6	Baja tolerancia a etanol (<5%). Necesidad de ajuste de la aeración
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Xilosa	31'5 °C	3'7	Baja tolerancia a etanol (<5%). Necesidad de ajuste de la aeración
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa	32 - 37 °C Óptima = 32 °C	4'5 – 4	Alta resistencia a etanol (10%)
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Glucosa	32 - 37 °C	4'5 – 6'5	Alta resistencia a etanol (10%)

<i>Saccharomyces bayanus</i>	Glucosa	18 - 22 °C	4	Muy alta resistencia a etanol (>18%)
<i>Saccharomyces pombe</i>	Glucosa	20 - 35 °C	3'3	Alta resistencia a etanol (10%)

Por otro lado, destacar que el futuro de los procesos de fermentación por levaduras para la obtención de biocombustibles está en el diseño de un proceso en el que las etapas de degradación de la biomasa, la sacarificación y la fermentación se realicen en un mismo reactor, todos juntos simultáneamente. Para ello la investigación actualmente se centra en el desarrollo de co-cultivos capaces de realizar todas las etapas llegando a un consenso de los diferentes parámetros, pero sobre todo se centra en la obtención de un solo microorganismo que sea capaz principalmente de:

- Realizar el proceso de sacarificación y liberar azúcares fermentables de los polímeros.
- Fermentar pentosas con un buen rendimiento.
- Fermentar hexosas e evitar la inhibición que produce la glucosa sobre el uso de toros sustratos.

Por último, destacar que uno de los factores más importantes estudiados en la obtención de bioetanol de 2ª generación es la mejora de los pretratamientos, destacando el desarrollo de los biológicos mediante la utilización de enzimas obtenidas de microorganismos o directamente mediante el cultivo de hongos (ya sean de podredumbre parda o blanca) sobre los diferentes sustratos.

## 11.- CONCLUSIONS

After the bibliographic review, we must highlight several aspects. First of all the main current interest in the development of biofuels as an alternative energy source that has a clearly exponential growth. In turn, most of the articles agreed on the characteristics of each generation of biofuels as well as the substrates used in each of them. Regarding the stages of each process, they are clearly defined and cited in most of the articles that related the processes. However, the fermentation conditions are far from being defined. Hardly any article showed data regarding the processes of temperatures, pH or times. In which we found some data of this type, they were fairly wide intervals, so optimal exact parameters have not been identified.

The main cause of this inexistence of exact data on the parameters used in these processes is due to the fact that it highly depends on the type of microorganisms and strains used. Each yeast strain has an optimal pH and catalytic activity temperature, as well as different concentrations of each product, by-product and substrate that affects each yeast used differently. At the same time, since attempts are being made to obtain yeasts with improved efficiency, most of the strains currently used have undergone mutation processes, either by spontaneous or directed mutation, which always modifies the optimal values of temperature, pH and others parameters, so it causes very little uniformity about these parameters. In addition to this we must add the fact that to implement the fermentation processes, co-cultures of different yeasts or microorganisms are being used to achieve good simultaneous fermentation of pentoses and hexoses, therefore the values of these parameters vary depending on the combinations used, which is very uneven in the articles consulted. The table below show the values collected so that the metabolic activity of the main yeasts used in the fermentation processes to obtain bioethanol.

**Table 2.-** Characteristics of the main yeasts used during the fermentation process.  
**Source:** Self elaboration (124-129, 70).

Yeast	Substrate	Temperature	pH	Characteristic
<i>Pichia stipites</i>	Xylose	26 - 35 °C	4 - 7 pH optimal = 6	Low tolerance to ethanol (<5%). Need to adjust the aeration. Very sensitive to the inhibitors present in the hydrolyzate (acetic acid)
<i>Candida shehatae</i>	Xylose	25 - 32 °C	3'5 - 7 pH optimal = 6	Low tolerance to ethanol (<5%). Need to adjust the aeration.
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Xylose	31'5 °C	3'7	Low tolerance to ethanol (<5%). Need to adjust the aeration.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucose	32 - 37 °C Optimal = 32 °C	4'5 - 4	High resistance to ethanol (10%).
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Glucose	32 - 37 °C	4'5 – 6'5	High resistance to ethanol (10%)
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Glucose	18 - 22 °C	4	High resistance to ethanol (>18%)
<i>Saccharomyces pombe</i>	Glucose	20 - 35 °C	3'3	High resistance to ethanol (10%)

On the other hand, it should be noted that the future of yeast fermentation processes for obtaining biofuels lies in the design of a process in which the stages of biomass degradation, saccharification and fermentation are carried out in the same reactor, all together simultaneously. For this, the research currently focuses on the development of co-cultures capable of performing all the stages, reaching a consensus on the different parameters, but above all, it focuses on obtaining a single microorganism that is mainly capable of:

- Carry out the scarification process and release fermentable sugars from the polymers.
- Ferment pentoses with good performance.
- Ferment hexoses and avoid the inhibition produced by glucose on the use of substrate bulls.

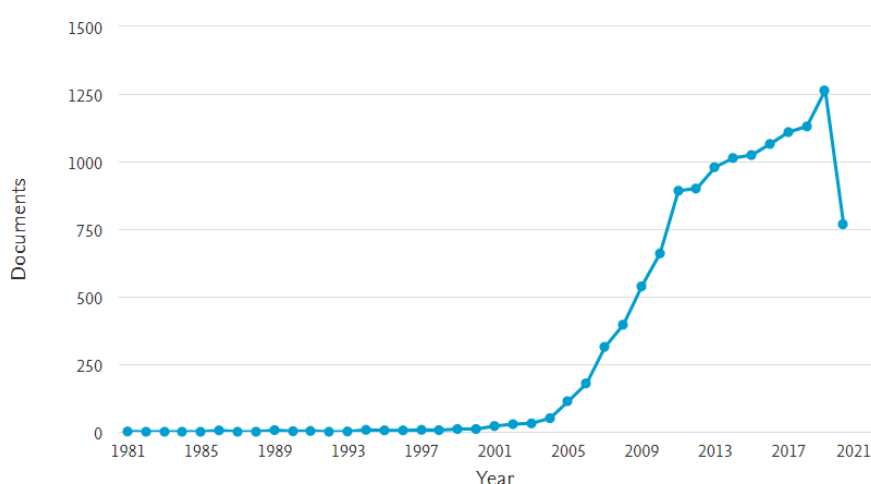
Finally, it should be noted that one of the most important factors studied in obtaining 2nd generation bioethanol is the improvement of pre-treatments, highlighting the development of biologics through the use of enzymes obtained from microorganisms or directly through the cultivation of fungi (either brown or white rot) on the different substrates.

## ANEXO 1

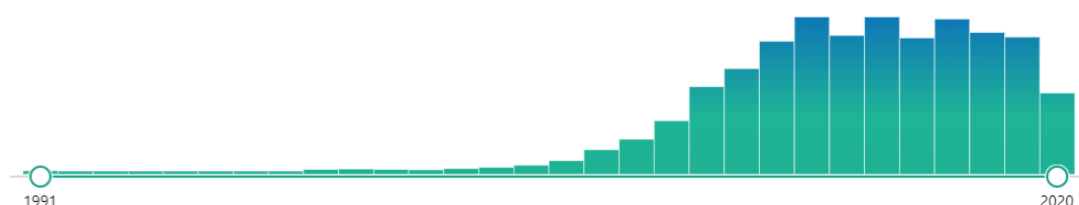
Como hemos mostrado previamente en el apartado número, queremos comprobar cuán extendida está la investigación actualmente. Para ello hemos acudido tanto a Scopus como a PubMed y hemos comprado los resultados obtenidos en cuanto a los artículos que almacenan ambas bases de datos.

Cuando buscamos el término “*bioethanol*” en Scopus hemos obtenido un total de 12,541 artículos siendo el primero publicado en 1981. Sin embargo, al buscar el mismo término en PubMed, únicamente nos encuentra 3,058 resultados (artículos, datando el primero en 1991, 10 años más tarde que el primero publicado en Scopus).

El hecho de que en la gráfica el dato de artículos depositados este año sea tan inferior es porque la búsqueda se ha realizado a mitad del año por lo que todavía faltan muchos meses durante los cuales se seguirán depositando artículos relacionados con el bioetanol.



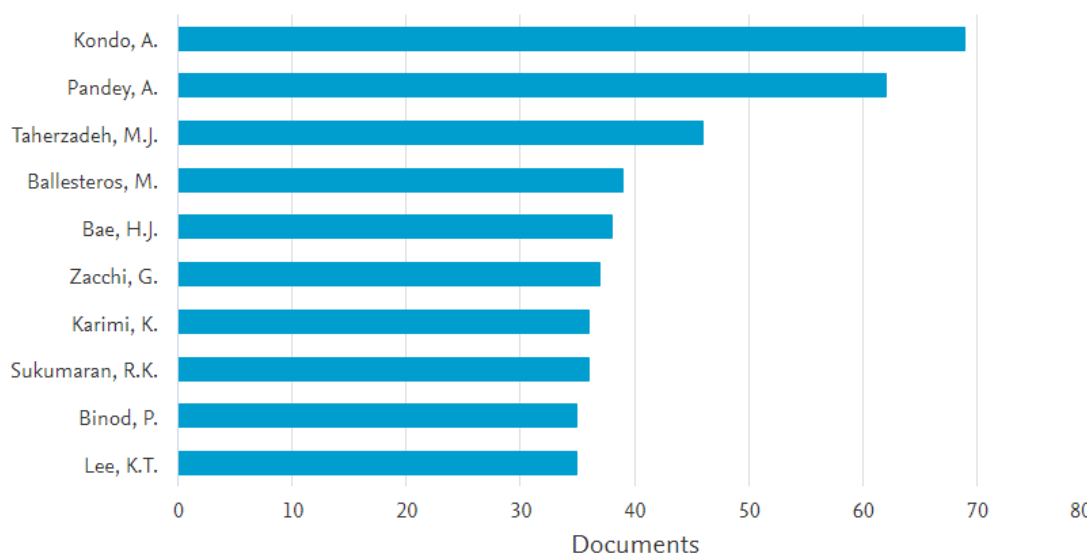
**Ilustración 1:** Gráfica de artículos depositados en Scopus cada año que contienen la palabra “*bioethanol*” obtenida. **Fuente:** *Elaborado por Scopus al analizar los resultados de la búsqueda de artículos referentes a los procesos de obtención de bioetanol.*



**Ilustración 2:** Gráfica de artículos depositados en PubMed cada año que contienen la palabra “*bioethanol*” obtenida. **Fuente:** *Elaborado por PubMed al analizar los resultados de la búsqueda de artículos referentes a los procesos de obtención de bioetanol.*

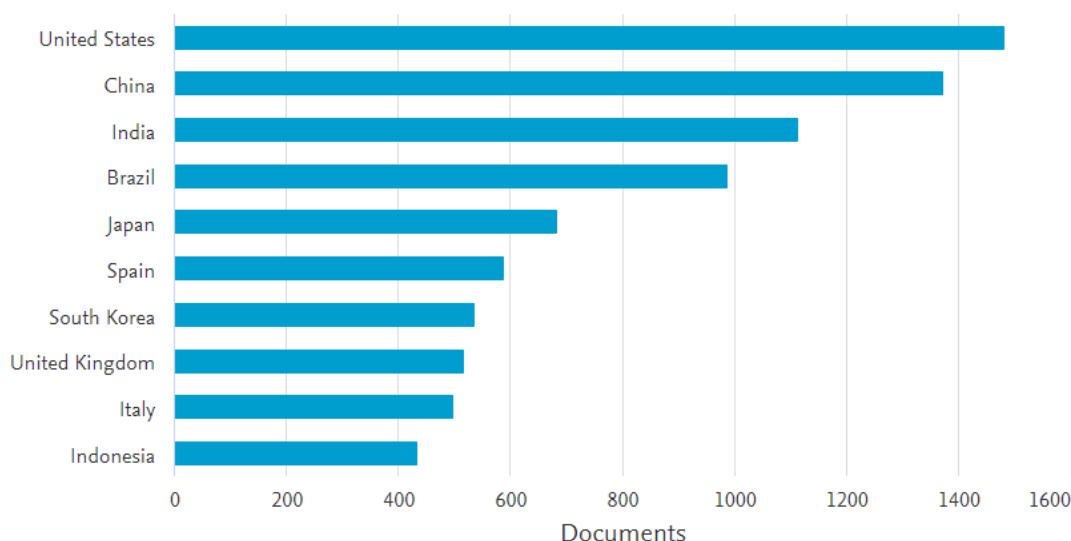
A continuación, realizamos un análisis para identificar los principales autores que trabajan en este campo, los diferentes países que más investigación están dedicando a esta área, las diferentes fuentes que han depositado los artículos en la bases de datos, así como las principales afiliaciones, las diferentes subáreas más trabajadas dentro de este campo y las diferentes variedades de documentos.

En la primera gráfica se recogen los 15 principales autores que han publicado más artículos respecto a este campo. Destacan principalmente A. Kondo y A. Pandey (Universidad de Kioto), los cuales han publicado respectivamente 69 y 62 artículos acerca del estudio de los procesos de obtención de bioetanol.



**Ilustración 3:** Principales autores que han depositado artículos relacionados con los procesos de obtención de bioetanol en la base de datos Scopus. **Fuente:** *Elaborado por Scopus al analizar los resultados de la búsqueda de artículos referentes a los procesos de obtención de bioetanol.*

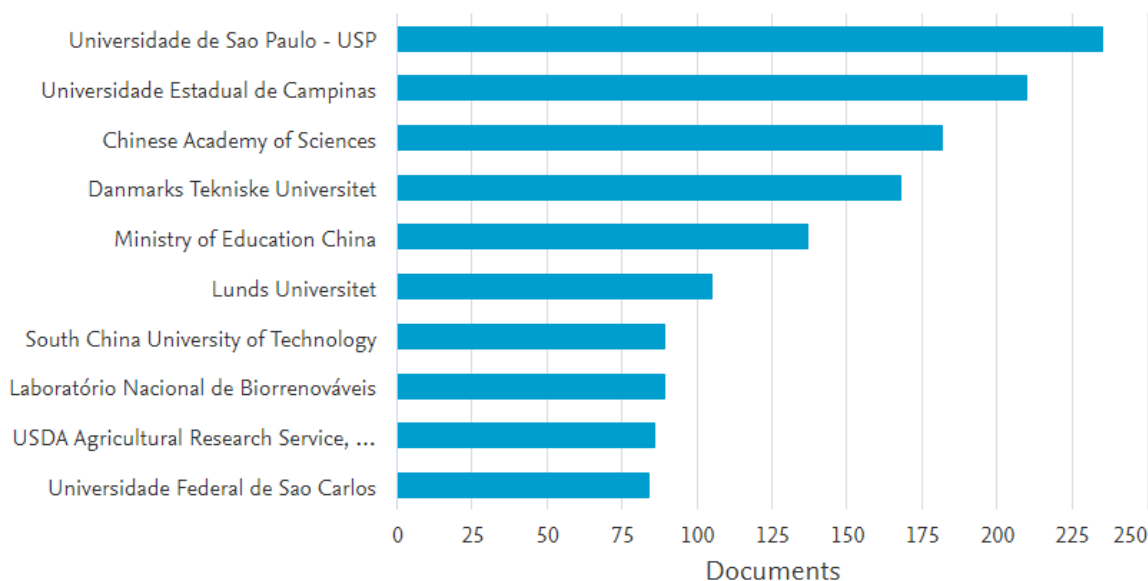
A continuación analizamos los países con mayor investigación en este campo. Como en la mayoría de campos, Estados Unidos y China están a la cabeza, seguidos de India y Brasil. Esto es debido que estos países poseen grandes campos de cultivos de los cereales utilizados como sustratos energéticos, como es el caso de Brasil y sus grandes extensiones de campos de azúcar de caña, uno de los sustratos más rentables y con mayor cantidad de azúcares fermentables.



**Ilustración 4:** Principales países en el campo de obtención de bioetanol en la base de datos Scopus. **Fuente:** *Elaborado por Scopus al analizar los resultados de la búsqueda de artículos referentes a los procesos de obtención de bioetanol.*

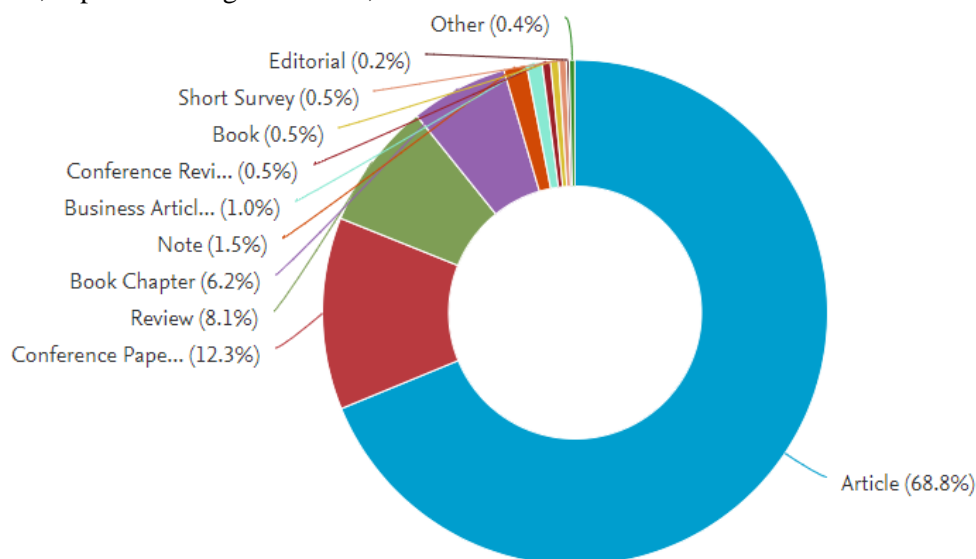


Ahora analizamos a su vez las principales universidades, centros e institutos de investigación que han depositado más artículos relacionados con el proceso de obtención de bioetanol en la base de datos de Scopus. Como podemos comprobar, las dos primeras pertenecen a dos universidades brasileñas que están muy a la orden del día en este campo de investigación por el motivo comentado en el apartado anterior. Podemos encontrar también diferentes universidades chinas y algunas europeas.



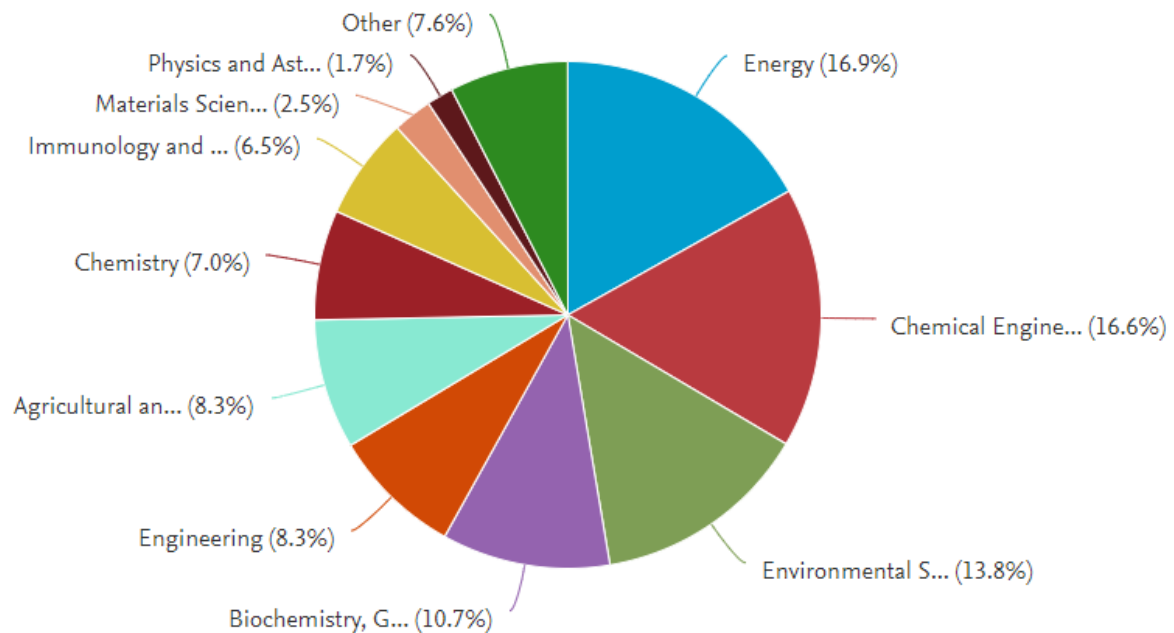
**Ilustración 5:** Principales universidades, institutos y centros de investigación con más artículos publicados en el campo de obtención de bioetanol en la base de datos Scopus. *Fuente: Elaborado por Scopus al analizar los resultados de la búsqueda de artículos referentes a los procesos de obtención de bioetanol.*

Respecto a los tipos de documentos recogidos en esta base de datos Scopus relacionados con los procesos de obtención de bioetanol principalmente y como era de esperar la mayor cantidad de documentos son artículos científicos (casi el 70%). También encontramos *papers* de conferencias, *reviews*, capítulos de algunos libros, etc.



**Ilustración 5:** Tipos de documentos recogidos en esta base de datos Scopus relacionados con los procesos de obtención de bioetanol. *Fuente: Elaborado por Scopus al analizar los resultados de la búsqueda de artículos referentes a los procesos de obtención de bioetanol.*

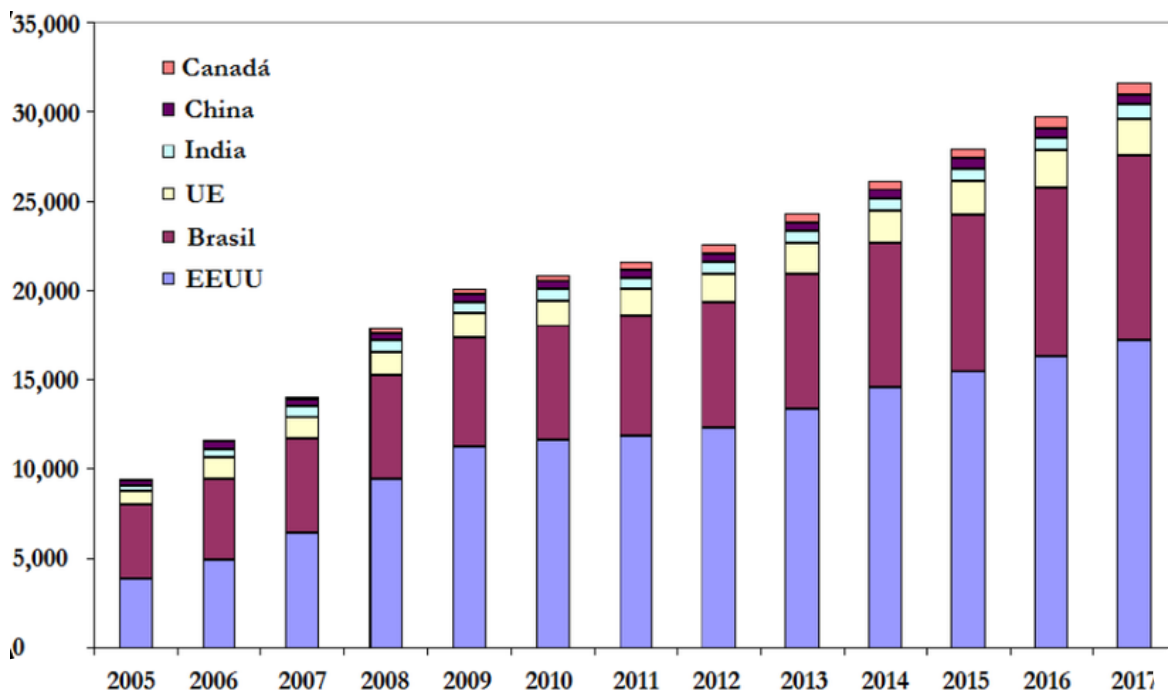
Como último apartado analizado de los documentos bibliográficos consultados y recopilados en la base de datos de Scopus analizamos las diferentes subcategorías en las que se clasifican estos artículos relacionados con los procesos de obtención de bioetanol. Entre ellos, las categorías más destacadas son Energía (16.9 %), Ingeniería Química (16.6 %) y Ciencia Medioambiental (13.8 %). Esto refleja las principales áreas de investigación que comprende este tema y los campos en los que se trabaja.



**Ilustración 6:** Principales áreas de investigación a las que pertenecen los artículos publicados en el campo de obtención de bioetanol en la base de datos Scopus. **Fuente:** *Elaborado por Scopus al analizar los resultados de la búsqueda de artículos referentes a los procesos de obtención de bioetanol.*

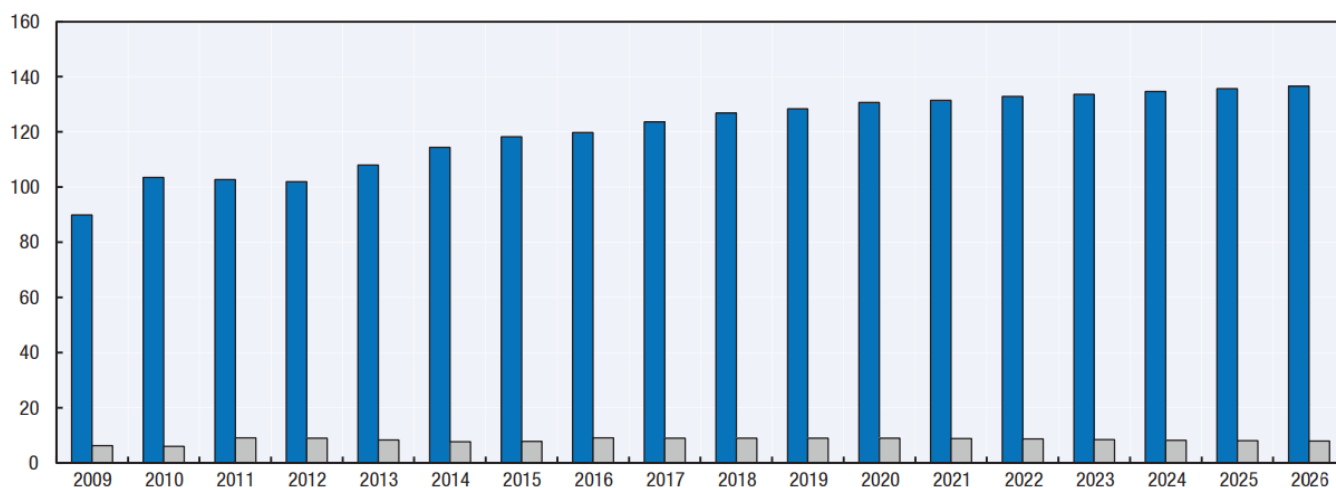
## ANEXO 2

Respecto al incremento en la producción de bioetanol, como podemos observar durante los últimos 15 años se ha ido incrementado poco a poco la producción global de bioetanol, con un efecto muy marcado de este incremento en Estados Unidos. Además, durante la última década, la producción se ha duplicado respecto a las cantidades de bioetanol obtenidas durante los primeros 10 años del siglo XXI.



**Ilustración 7:** Producción Mundial de Bioetanol, 2005-2017 en millones de galones. *Fuente:* FAPRI 2008 U.S. y World Agriculture Outlook.

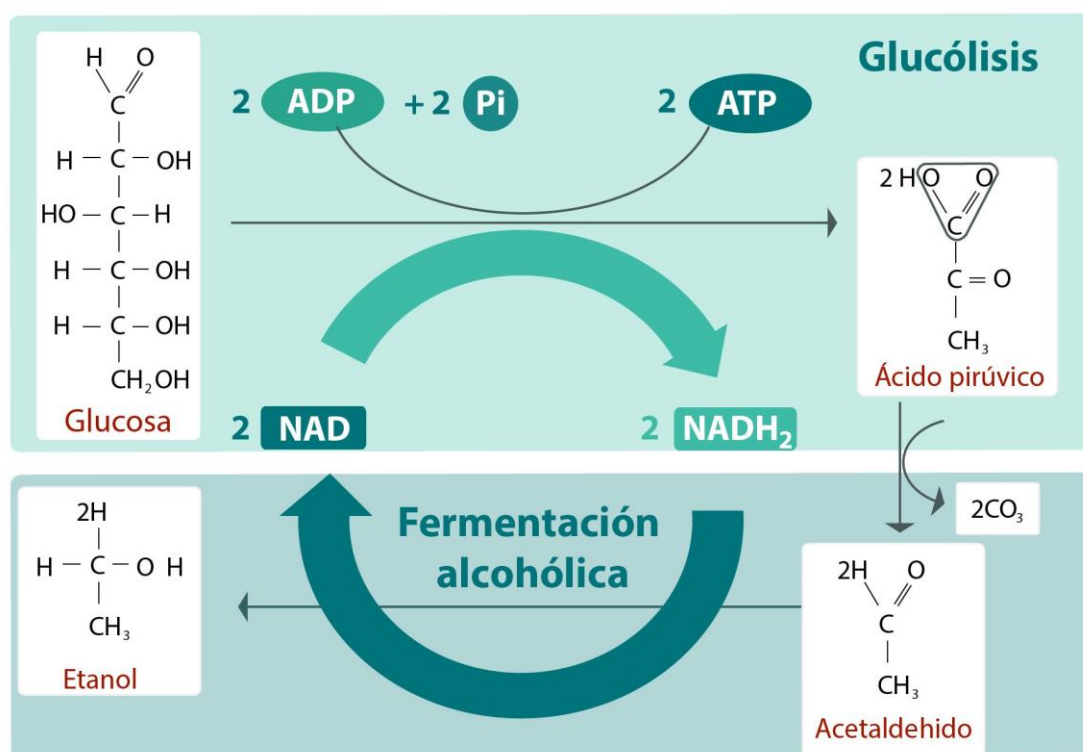
Mml



**Ilustración 8:** Gráfica de comparación entre la producción y comercio de bioetanol entre 2009 y 2026 en miles de millones de litros. **En azul:** Producción de bioetanol durante los últimos años y predicción de su producción durante los próximos 6 años. **En gris:** La comercialización y su predicción durante los próximos años. *Fuente:* OCDE/FAO (2017), "OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas", Estadísticas de la OCDE sobre agricultura (base de datos), <http://dx.doi.org/10.1787/>

### ANEXO 3

Exposición de las diferentes reacciones, así como los productos y sustratos moleculares, que componen la ruta del metabolismo de la glucosa en ausencia de oxígeno. Como podemos ver, se compone de 2 etapas: la glucólisis y la fermentación alcohólica. El balance final es la obtención de 2 moléculas de ATP, 2 moléculas de  $\text{CO}_2$  y 2 moléculas de etanol a partir de 1 única molécula de glucosa. Durante la glucólisis, a partir de 1 molécula de glucosa se producen las dos moléculas de ATP, 2 moléculas de  $\text{NADH}_2$  y 2 moléculas de ácido pirúvico, por lo tanto se necesitan regenerar las 2 moléculas  $\text{NAD}^+$  utilizadas durante la glucólisis. Para ello se produce la etapa de fermentación obteniendo a partir de cada molécula de ácido pirúvico una molécula de  $\text{CO}_2$  y otra de etanol regenerando el  $\text{NAD}^+$ .



**Ilustración 10:** Esquema del proceso de la fermentación alcohólica.

**Fuente:** <https://www.mindomo.com/eu/mindmap/fermentacion-alcoholica>

## ANEXO 4

**Tabla 3.-** Biorrefinerías destacadas para la obtención de combustibles de 2ª generación.

**Fuente:** Cristina M. M. Machado; “Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe”, *Biocombustibles de 2da y 3ra Generación – OLADE/IICA (2010)*.

EMPRESA	LOCAL	MATERIA PRIMA	PRODUCTO	ESCALA	INICIO	WEBSITE
BioGasol / AAU	Dinamarca	Forrajeras, residuos agrícolas	Etanol; bio-gas; lignina	Piloto	2009	<a href="http://www.biogasol.com">http://www.biogasol.com</a>
Borregaard Industries LTD	Noruega	Residuos de la industria papelera	Etanol	Comercial	1930	<a href="http://www.borregaard.com">http://www.borregaard.com</a>
Frontier Renewable Resources	EUA	Madera	Etanol; lignina	Comercial	---	<a href="http://frontier-renewable.com">http://frontier-renewable.com</a>
KL Energy Corporation	EUA	Residuos forestales y de la industria papelera	Etanol	Demostración	2007	<a href="http://www.klenergycorp.com/">http://www.klenergycorp.com/</a>
Lignol Energy Corporation	EUA Canadá	Residuos forestales y agroindustriales	Etanol; lignina	Demostración Piloto	2012 2009	<a href="http://www.lignol.ca">http://www.lignol.ca</a>
M-real Hallein AG	Austria	Residuos de la industria papelera	Etanol	Demostración	Planeada	<a href="http://www.m-real.com">http://www.m-real.com</a>
Mossi & Ghisolfi - Chemtex	Italia	Residuos agrícolas y madera	Etanol	Piloto	2009	<a href="http://www.gruppomg.com">http://www.gruppomg.com</a>
Pacific Ethanol	EUA	Residuos agrícolas y forestales	Etanol; bio-gas; lignina	Demostración	2009	<a href="http://www.pacificethanol.net">http://www.pacificethanol.net</a>
POET	EUA	Residuos agrícolas	Etanol	Piloto	2008	<a href="http://www.poet.com">http://www.poet.com</a>
Queensland University of Technology	Australia	Bagazo de caña de azúcar y otros residuos	Etanol	Piloto	2010	<a href="http://www.qut.edu.au">http://www.qut.edu.au</a>
SEKAB	Suecia	Residuos agrícolas (especialmente bagazo de caña de azúcar) y forestales	Etanol	Piloto Demostración Industrial	2004 2011 2016	<a href="http://www.sekab.com">http://www.sekab.com</a>
Technical University of Denmark (DTU)	Dinamarca	Residuos agrícolas	Etanol; bio-gas; lignina	Piloto	2006	<a href="http://www.biogasol.com">http://www.biogasol.com</a>
Terrabon	EUA	Residuos sólidos municipales, residuos agrícolas y cultivos dedicados	Etanol; otros productos químicos	Demostración	2009	<a href="http://www.terrabon.com/">http://www.terrabon.com/</a>
Verenium	EUA	Residuos agrícolas y forestales, cultivos dedicados	Etanol	Piloto Demostración	2007 2009	<a href="http://www.verenium.com">http://www.verenium.com</a>
Weyland AS	Noruega	Residuos forestales	Etanol	Piloto	2009	<a href="http://www.veyland.no">http://www.veyland.no</a>

## ANEXO 5

**Tabla 4.-**Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica mayoritariamente utilizados y sus principales parámetros y características.

**Fuente:** Cristina M. M. Machado; “Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe”, *Biocombustibles de 2da y 3ra Generación – OLADE/IICA (2010)*.

MÉTODO	PROCESO/AGENTE	OBSERVACIONES
<b>MÉTODOS FÍSICOS</b>		
Cominución	Trituración; molienda	Molino de bolas (tamaño final 0,2-2 mm); molino de cuchillos o martillos (tamaño final 3-6 mm)
Pirolisis	T > 300 °C, seguida por enfriamiento y condensación	Formación de productos volátiles y carbón. Los residuos pueden pasar por una hidrólisis ácida en condiciones blandas (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 N, 2,5 h a 95 °C) para producir 80-85% de azúcares reductores (> 50% de glucosa). Puede ser conducida en vacío (400 °C, 1 mmHg, 20 min).
<b>MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS</b>		
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160 – 290 °C, p = 0,69-4,85 MPa por algunos minutos, seguido por descompresión hasta presión atmosférica	Reducción de tamaño con menor <i>input</i> de energía, si es comparado con la cominución; Hidrólisis de 80-100% de la hemicelulosa, degradación de parte de la fracción de xilana (45-65% de recuperación de la xilosa); Hay cierto grado de despolimerización de la celulosa; La lignina no es solubilizada, pero redistribuida; Formación de inhibidores; Adición de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , SO <sub>2</sub> o CO <sub>2</sub> aumenta la eficiencia de hidrólisis enzimática subsecuente
Agua caliente	Agua caliente presurizada, p > MPa, T = 170-230 °C, 1-46 min; solución con < 20% de sólidos	80-100% de hidrólisis de la hemicelulosa, 88-98% de recuperación de la xilosa, > 50% oligómeros; Hay cierto grado de despolimerización de la celulosa y conversión subsecuente de un 90%; Solubilización parcial de la lignina (20-50%); Baja o ninguna formación de inhibidores

Explosión con amoníaco diluido (AFEX)	1-2 kg amoníaco/kg biomasa seca. 90 °C, 30 min, p = 1,12-1,36 MPa	Es la versión alcalina de la explosión a vapor, y es necesaria la recuperación del amoníaco; 0-60% de hidrólisis de la hemicelulosa, dependiendo de la humedad Hay cierto grado de despolimerización de la celulosa y su conversión subsecuente puede llegar a >90%, para biomasa con alto grado de lignina; 10-20% de solubilización de lignina; No hay formación de inhibidores
Explosión de CO <sub>2</sub>	4 kg CO <sub>2</sub> /kg fibra, p = 5,6 MPa	No hay formación de inhibidores; Conversión subsecuente de la celulosa puede ser >75%
<b>MÉTODOS QUÍMICOS</b>		
Ozonólisis	Ozono a temperatura ambiente y presión	No hay formación de inhibidores Conversión subsecuente de la celulosa puede ser >57% Degradación de la lignina
Hidrólisis con ácido diluido	0,75-5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, o HNO <sub>3</sub> , p ≈ 1 MPa, Proceso Continuo: bajo cargamento de sólidos (5-10% en peso); T = 160-200 °C; Proceso discontinuo: alto cargamento de sólidos (10-40% en peso); T = 120-160 °C	Es necesaria la corrección de pH, lo que genera yeso como residuo; 80-100% de la hemicelulosa es hidrolizada, con una recuperación de 75-90% de xilosa; Hay cierto grado de despolimerización de la celulosa y su conversión subsecuente es favorecida por el uso de mayores temperaturas; La lignina no es solubilizada, siendo, sin embargo, redistribuida
Hidrólisis con ácido concentrado	10-30% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, 170-190 °C, razón sólido-líquido 1:1,6 21-60% ácido paracético	Necesaria la recuperación del ácido; Tiempo de residencia es mayor si es comparado al ácido diluido; El ácido paracético provoca oxidación de la lignina
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h, 60 °C; Ca(OH) <sub>2</sub> , 4 h, 120 °C; Puede ser complementada por la adición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,5-2,15 vol.%) a baja temperatura (35 °C)	Costo del reactor es menor si es comparado a la hidrólisis ácida; >50 % de hidrólisis de la hemicelulosa con 60-75% de recuperación de la xilosa; Baja formación de inhibidores; Expansión de la celulosa y conversión subsecuente pudiendo llegar a >65%; 25-55% de remoción de la lignina en maderas duras (menor que eso)

		para maderas blandas)
Delignificación oxidativa	Peroxidase e 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 20 °C, 8 h	Prácticamente total solubilización de la hemicelulosa; Conversión subsecuente de la celulosa hasta un 95%; Solubilización de 50% de la lignina
Oxidación húmeda	1,2 MPa de presión de oxígeno, 195 °C, 15 min., adición de agua y pequeñas cantidades de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> o H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Solubilización de la mayor parte de la hemicelulosa; Formación de inhibidores; Degradación de la lignina;
Proceso Organosolvente	Solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol, tritrietilenglicol) con 1% de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o HCl, 185 °C, 30-60 minutos, pH = 2-3,4	Recuperación de solvente requerida; Hidrólisis prácticamente completa de la hemicelulosa y alto rendimiento en xilosa; Solubilización prácticamente total de la lignina y ruptura de los enlaces internos de lignina y hemicelulosa
<b>MÉTODOS BIOLÓGICOS</b>		
Hongos	Uso de hongos o macrohongos descompositores de la madera por fermentación en el estado sólido	Diversos hongos producen diversas enzimas degradadoras de la pared celular (celulasas, hemicelulasas, ligninasas, peroxidasas, polifenoloxidasas, etc.); Proceso muy lento, demora semanas
Proceso Bio-organosolv	Fermentación de <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> por 2-8 semanas seguida de etanólise a 140-200 °C por 2 h	El hongo descompone la red de lignina y la acción del etanol permite la hidrólisis de la hemicelulosa; El pre-tratamiento biológico lleva a una economía de un 15% de la electricidad necesaria para etanólisis; El etanol puede ser reutilizado; proceso ambientalmente correcto.



## ANEXO 6

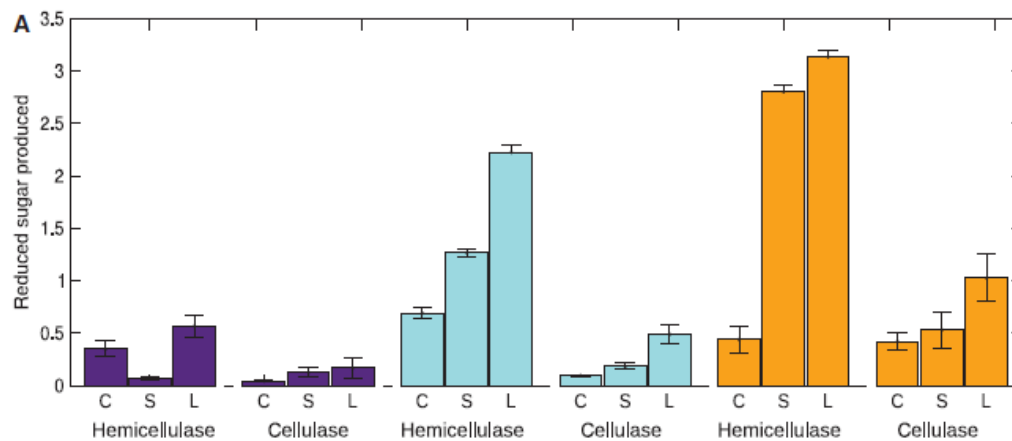
**Tabla 5.-** Variación en el costo de producción de bioetanol de 1ª generación de acuerdo con la fuente de carbono y materia prima utilizada en cada país. (Chauvet y González, 2008).

*Fuente:* Michelle Chauvet y Rosa Luz González; *Biocombustibles Y Cultivos Biofarmacéuticos: ¿Oportunidades O Amenazas?*, (2008) *El Cotidiano*, enero-febrero, año/vol. 23, número 147.

Fuente de Carbono	Cultivo	Rendimiento (Its/tonelada de cultivo)	Rendimiento (Its/ha)	Costo de Producción (USD/litro)	País
<b>Sacarosa</b>	Remolacha (jugo)	100	7000	0.48	Unión Europea
	Caña (jugo)	70 – 85	6000	0.21	Brasil
	Caña (jugo)	10	590	0.32	India
	Caña (melaza)	10	730	0.23 -0.37	México
	Sogo	56 – 90	2500 – 4000	-	Suecia
<b>Almidón</b>	Maíz	400	3000	0.29 – 0.37	Estados Unidos
	Trigo	340	2700	0.62	Unión Europea
	Maíz/trigo	285	-	0.59	Estados Unidos
<b>Celulosa</b>	Bagazo (caña)	55	3850	0.8	Chile

## ANEXO 7

Representación gráfica de la expresión de enzimas en diferentes sustratos mencionada en la segunda mejora de la memoria.



**Ilustración 11:** Actividades de enzimas en cultivos de glucosa (púrpura), hemicelulosa (turquesa) o celulosa (naranja) preparados a partir de la fracción celular (C), sobrenadante (S), o lisados de cultivo completo (L). Gráfica referida al estudio de la 2ª mejora expuesta en la memoria. **Fuente:** A.C. Tolonen, W. Haas, A. C. Chilaka, J. Aach, S. P Gygi and G. M Church "Proteome-wide systems analysis of a cellulosic biofuel-producing microbe" *Molecular Systems Biology* 7:461 (2011).

## ANEXO 8

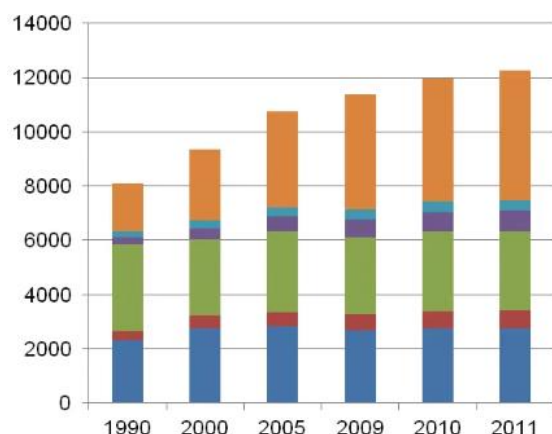
Para contextualizar el gran consumo energético producido actualmente presentamos la siguiente tabla en la que se expresan los millones de barriles equivalentes de petróleo por día. Como podemos comprobar, el país con mayor consumo total es China con 60.54 millones de barriles equivalentes de petróleo diarios, seguido de EE.UU, las dos principales potencias actuales. Sin embargo, países menos desarrollados como Tailandia o México ocupan los últimos puestos en la tabla.

**Tabla 6.-** Consumo de Energía Primaria del año 2015 (representado en millones de barriles equivalentes de petróleo diarios).

**Fuente:** Jaime Santillana y Julia Salinas de Santillana; “Presentación del anuario estadístico de energía 2015 de BP”, Ing. Químicos (UNI), M.S. in Ch.E. (U - Wisconsin Madison, U - Illinois Urbana Champaign, 2015).

	Petróleo	Gas Natural	Carbón	Energía Nuclear	Hidroelectricidad	Renovables	Total
<b>Mundo</b>	87.00	62.97	77.13	11.71	17.94	7.33	264.08
<b>China</b>	11.24	3.57	38.57	0.78	5.12	1.26	60.54
<b>EE.UU</b>	17.11	14.33	7.96	3.81	1.15	1.44	45.81
<b>India</b>	3.93	0.91	8.18	0.17	0.57	0.31	14.07
<b>Rusia</b>	2.87	7.08	1.78	0.89	0.77	0.00	13.39
<b>Japón</b>	3.81	2.05	2.40	0.02	0.44	0.29	9.01
<b>Canada</b>	2.01	1.85	0.40	0.47	1.74	0.15	6.63
<b>Alemania</b>	2.21	1.35	1.57	0.42	0.09	0.80	6.64
<b>Brasil</b>	2.76	0.74	0.35	0.07	1.64	0.33	5.88
<b>Corea del Sur</b>	2.28	0.79	1.70	0.75	0.01	0.03	5.56
<b>Iran</b>	1.79	3.46	0.02	0.02	0.08	0.00	5.37
<b>Arabia Saudi</b>	3.38	1.92	0.00	-	-	0.00	5.30
<b>México</b>	1.69	1.50	0.26	0.05	0.14	0.07	3.72
<b>Tailandia</b>	1.14	0.96	0.35	-	0.02	0.05	2.51

## Mtep Aumento del consumo



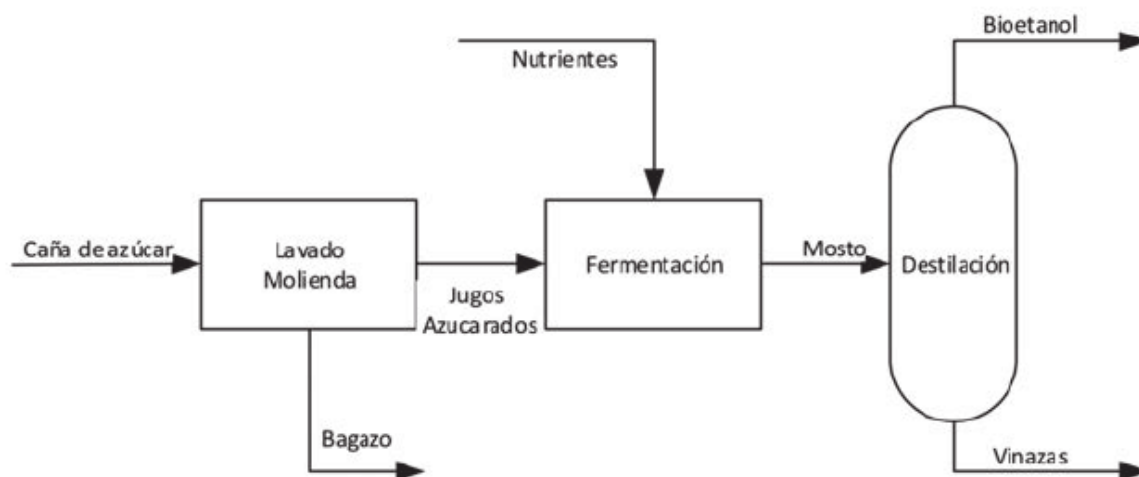
En esta gráfica se muestra el aumento de consumo energético en las diferentes regiones durante la década de 1990-2011 con el “boom” de la tecnología que se incrementará aún más durante las próximas décadas.

**Naranja:** Asia pacífico y Oceanía  
**Azul claro:** África  
**Morado:** Oriente medio  
**Verde:** Europa y Asia europea  
**Rojo:** América del Centro y del Sur  
**Azul oscuro:** EE.UU

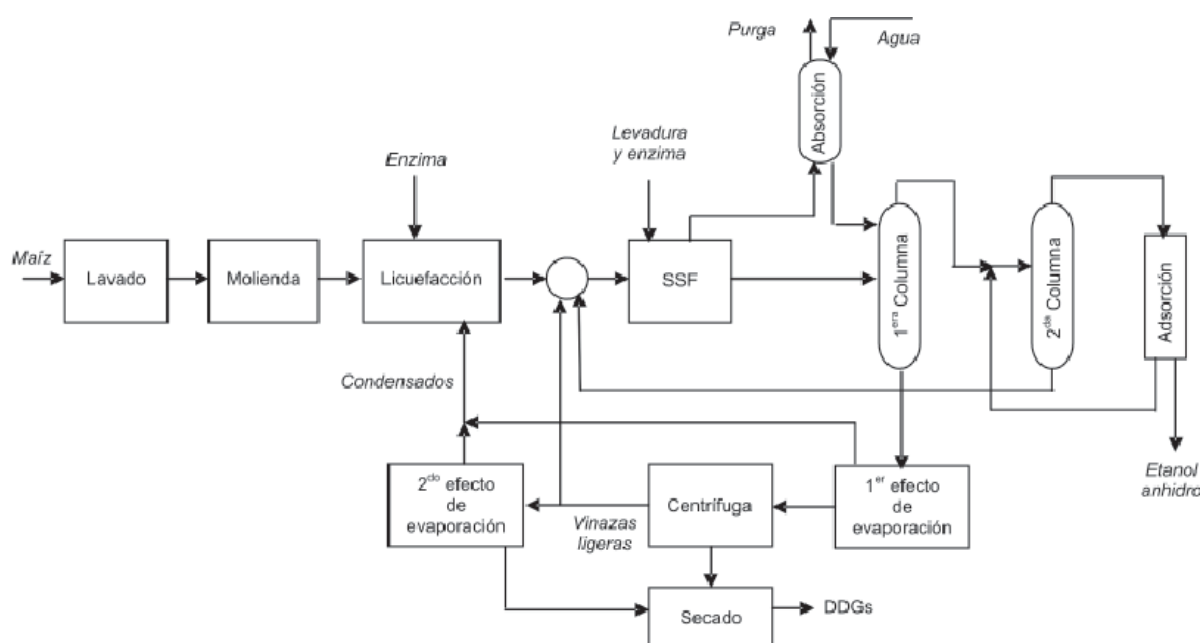
**Ilustración 12:** Aumento del consumo energético medido en millones de toneladas equivalentes de petróleo durante los años 1990-2011. **Fuente:** Lema Rodicio JM y María López Abelairas; “Retos y Oportunidades de los biocombustibles”, (2009).

## ANEXO 9

En este anexo hemos querido representar algunos esquemas simplificados del proceso de obtención de bioetanol a partir de ejemplos de las materias primas principalmente utilizadas en los combustibles de 1ª generación como son el maíz y la caña de azúcar. Como hemos comentado en la memoria, el hecho de que el trigo sea un cereal requiere de etapas extras para obtener azúcares fermentables del grano, como es el caso de la licuefacción. El esquema de la caña de azúcar presenta una mayor simplificación que el del trigo, el cual se muestra más detalladamente sus etapas.



**Ilustración 13:** Esquema simplificado de las etapas del proceso de obtención de bioetanol a partir de caña de azúcar. **Fuente:** Carlos Ariel Cardona, María Isabel Montoya, Julian Andres Quintero y Óscar J. Sánchez; “Evaluación económica del proceso de obtención de alcohol carburante a partir de caña de azúcar y maíz”, DOAJ (2015).



**Ilustración 14:** Esquema simplificado de las etapas del proceso de obtención de bioetanol a partir de maíz. **Fuente:** Jhonathan Mauricio Vargas-Barbosa y Jaime Alberto Giraldo-García, “Modelo de entrenamiento en toma de decisiones relacionadas con gestión de producción y operaciones de un sistema de fabricación de bioetanol”, ECKNE Vol. 12 Número 1, Junio 2015 • 7 – 16.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- S. Darda, T. Papalas, A. Zabaniotou; ***“Biofuels journey in Europe: Currently the way to low carbon economy sustainability is still a challenge”***, Journal of Cleaner Production 208:575-588 (2019).
- 2.- J.M. Lema Rodicio y M. López Abelairas; ***“Retos y oportunidades de los biocombustibles”***, Universidad de Santiago de Compostela (2009).
- 3.- Rosa Méndez y Rafael Moliner; ***“Energía sin CO<sub>2</sub>: Realidad o utopía”***, Consejo Superior de Investigaciones Científicas; Los libros de la Catarata, 14:54-57 (2011).
- 4.- F. D. Ramos, M. S. Díaz y M. A. Villar; ***“Biocombustibles”***, Planta Piloto de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur-Conicet, Volumen 25 número 147 enero – febrero (2016).
- 5.- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, <http://www.minetur.gob.es/energia/desarrollo/EnergiaRenovable/Paginas/paner.aspx>
- 6.- J. I. Hormaeche, Á. Pérez y T. Saénz; ***“El petróleo y la energía en la economía: Los efectos económicos del encarecimiento del petróleo en la economía vasca”***, IKEI Research and Consultancy Centro de Estudios Económicos Tomillo, CEET (2018).
- 7.- Instituto para la Diversificación y Ahorro de Energía; ***“Resumen del Plan de Energías Renovables 2011-2020”***, Gobierno de España, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo, 3-9 (2011).
- 8.- ***“Directiva 2003/30/ce del parlamento europeo y del consejo de 8 de mayo de 2003 relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte”***, Diario Oficial de la Unión Europea, L 123/42 ES 17.5.2003
- 9.- Ana Isabel de Lucas Herguedas y Dra. Ingeniera de Montes; ***“Biomasa, biocombustibles y sostenibilidad”***, Bloque II, 8-10 (2012).
- 10.- Willian Giovanni Cortes Ortiz; ***“Lignocellulosic material as source of biofuels and chemical products”***, TECNO ESUFA 41, volume 16, Diciembre de 2011.
- 11.- Pepijn Prinsen; ***“Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas”***, Memoria del proyecto desarrollado durante el período de investigación del Master en “Estudios Avanzados en Química”, (CSIC) (2010).
- 12.- Angel T. Martínez, Francisco J. Ruiz-Dueñas, Susana Camarero, Ana Serrano, et al.; ***“Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations”***, Biotechnology Advances 35 (2017) 815–831.
- 13.- Verónica Leticia Colin, Analía Rodríguez, and Héctor Antonio Cristóbal; ***“The Role of Synthetic Biology in the Design of Microbial Cell Factories for Biofuel Production”***, Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011, Article ID 601834 (2011).
- 14.- Martín, C., Manzanares, P.; ***“Biomasa lignocelulósica. Polímeros constitutivos. Procesos biológicos de degradación de la lignina”***, Instituto de Energías Renovables, Ciemat 754, (1994).
- 15.- Shota Atsumi and James C Liao; ***“Metabolic engineering for advanced biofuels production from Escherichia coli”***, Advanced Biofuels Atsumi and Liao 415, Current Opinion in Biotechnology 2008, 19:414–419.

- 16.- Fernando Daniel Ramos, María Soledad Díaz y Marcelo Armando Villar; ***“Biocombustibles”***, Universidad Nacional del Sur-Conicet, Volumen 25 número 147 enero - febrero 2016.
- 17.- H.J. Vázquez y O. Dacosta; ***“Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas”***, Ingeniería Investigación y Tecnología VIII. 4. 249-259, 2007.
- 18.- Ferreira P.; ***“Estudios estructura función sobre la enzima Aril-alcohol oxidasa implicada en la Biodegradación de la Lignina”*** (2004).
- 19.- Jonathan M. Galazka et al.; ***“Cellodextrin Transport in Yeast for Improved Biofuel Production”***, Science 330, 84 (2010).
- 20.- John H. Grabber; ***“How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies”***, Crop Science Society of America, 45:820–831 (2005).
- 21.- Michael E. Himmel et al.; ***“Production Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels”***, Science 315, 804 (2007).
- 22.- Elisabeth Joelsson, Borbála Erdei, Mats Galbe and Ola Wallberg; ***“Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw”***, Biotechnololy for Biofuels (2016) 9:1.
- 23.- Ja Kyong Ko , Youngsoon Um, Han Min Woo, Kyoung Heon Kim and Sun-Mi Lee; ***“Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered Saccharomyces cerevisiae harboring xylose isomerase-based pathway”***, Bioresource Technology 209 (2016) 290–296.
- 24.- Alexander May, Shrinath Narayanan, Joe Alcock, Arvind Varsani, Carlo Maley and Athena Aktipis; ***“Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem”***, PeerJ (2019), DOI 10.7717/peerj.7565.
- 25.- Pritam Kundu, Bharat Manna, Subham Majumder and Amit Ghosh; ***“Species-wide Metabolic Interaction Network for Understanding Natural Lignocellulose Digestion in Termite Gut Microbiota”***, Scientific Reports | (2019) 9:16329.
- 26.- Sung Kuk Lee, Howard Chou, Timothy S Ham, Taek Soon Lee and Jay D Keasling; ***“Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels”***, Current Opinion in Biotechnology 2008, 19:556–563.
- 27.- Sun-Mi Lee, Taylor Jellison and Hal S. Alper; ***“Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in Saccharomyces cerevisiae for efficient conversion yields”***, Biotechnology for Biofuels 2014, 7:122.
- 28.- Cho-Ryong Lee, Bong Hyun Sung, Kwang-Mook Lim, Mi-Jin Kim, Min Jeong Sohn, Jung-Hoon Bae and Jung-Hoon Sohn; ***“Co-fermentation using Recombinant Saccharomyces cerevisiae Yeast Strains Hypersecreting Different Cellulases for the Production of Cellulosic Bioethanol”***, Scientific Reports | 7: 4428 (Junio-2017).

- 29.- Ángel T. Martínez, Francisco J. Ruiz-Dueñas, María Jesús Martínez, José C. del Río and Ana Gutiérrez; ***“Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill”***, Current Opinion in Biotechnology 2009, 20:348–357.
- 30.- Silvia Morales de la Rosa; Memoria para aspirar al grado de doctor en ciencias químicas; ***“Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos”***, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (2015).
- 31.- Francisco B. Pereira, Pedro M.R. Guimarães, José A. Teixeira, and Lucília Domingues; ***“Robust industrial Saccharomyces cerevisiae strains for very high gravity bio-ethanol fermentations”***, Journal of Bioscience and Bioengineering, VOL. 112 No. 2, 130–136, 2011.
- 32.- Andrew C. Tolonen, Wilhelm Haas, Amanda C. Chilaka, John Aach, Steven P. Gygi and George M. Church; ***“Proteome-wide systems analysis of a cellulosic biofuel-producing microbe”***, Molecular Systems Biology 7:461 (2010).
- 33.- John Ralph, Catherine Lapierre and Wout Boerjan; ***“Lignin structure and its engineering”***, Current Opinion in Biotechnology 2019, 56:240–249.
- 34.- Charlotte Schubert; ***“Can biofuels finally take center stage?”***, Nature Biotechnology Volume 24 Number 7 July 2006.
- 35.- Justin B. Sluiter, Raymond O. Ruiz, Christopher J. Scarlata, Amie D. Sluiter, and David W. Templeton; ***“Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. Review and Description of Methods”***, J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 9043–9053.
- 36.- Phuong Tran Nguyen Hoang, Ja Kyong Ko, Gyeongtaek Gong, Youngsoon Um, and Sun-Mi Lee; ***“Genomic and phenotypic characterization of a refactored xylose-utilizing Saccharomyces cerevisiae strain for lignocellulosic biofuel production”***, Biotechnology for Biofuels (2018) 11:268.
- 37.- Andreas Otto Wagner, Nina Lackner, Mira Mutschlechner, Eva Maria Prem , Rudolf Markt and Paul Illmer; ***“Biological Pretreatment Strategies for Second-Generation Lignocellulosic Resources to Enhance Biogas Production”***, Energies 2018, 11:1797.
- 38.- R. Bachmann, McKinsey and Company; ***“Industrial Biotech – New Value-Creation Opportunities”***, Presentation at the Bio-Conference; New York; 2003.
- 39.- ***“United Nations Framework Convention on Climate Change”***, 2003, [www.unfccc.int](http://www.unfccc.int).
- 40.- A. Aden et al. and L. Montague et al.; ***“Lignocellulosic Bio-mass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover”***, <http://www.nrel.gov/docs/fy02osti/32438.pdf>; (2002).
- 41.- ***“White Biotechnology: Gateway to a More Sustainable Future”***, [www.europabio.org](http://www.europabio.org), EuropaBio (2003).
- 42.- Sofia Dashko, Nerve Zhou, Concetta Compagno and Jure Piskur; ***“Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?”***, FEMS Yeast Res 14 (2014) 826–832.

- 43.- Daehwan Kim; ***“Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review”***, Molecules 2018, 23, 309.
- 44.- Graeme M. Walker, Roy S. K. Walker; ***“Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations”***, Advances in Applied Microbiology 2018; 105:87-129.
- 45.- Mickel L. A. Jansen, Jasmine M. Bracher, Ioannis Papapetridis, Maarten D. Verhoeven et al.; ***“Saccharomyces Cerevisiae Strains for Second-Generation Ethanol Production: From Academic Exploration to Industrial Implementation”***, FEMS Yeast Research, 2017, Vol. 17, No. 5.
- 46.- Kevy Pontes Eliodório, Gabriel Caetano de Gois E Cunha, Caroline Müller, Ana Carolina et al.; ***“Advances in Yeast Alcoholic Fermentations for the Production of Bioethanol, Beer and Wine”***, Advances in Applied Microbiology, 2019; 109:61-119.
- 47.- Jin Hou, Chenxi Qiu, Yu Shen, Hongxing Li, Xiaoming Bao; ***“Engineering of Saccharomyces Cerevisiae for the Efficient Co-Utilization of Glucose and Xylose”***, FEMS Yeast Res 2017 Jun 1;17(4).
- 48.- I. K. Lappa, A. Papadaki, V. Kachrimanidou, A. Terpou, D. Koulougliotis, E. Eriotou and N. Kopsahelis, Cheese ***“Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications”***, Foods v.8(8); (2019).
- 49.- W. J. Guerrero Rodríguez, C. A. Gómez Aldapa, C. A. Gómez Ramírez, J<sup>a</sup> Castro Rojas, ***“Lactosuero y su problemática en el medio ambiente”***, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (2018).
- 50.- A. V. Araujo Guerra , L. M.Monsalve Castro & A. L. Quintero Tovar, ***“Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental”*** Revista de Investigación Agraria y Ambiental – Volumen 4 Número 2, (2013).
- 51.- E. Valencia Denicia, M. L. Ramírez Castillo, ***“La industria de la leche y la contaminación del agua”*** Elementos: Ciencia y cultura, Vol. 16, Núm. 73, (2009).
- 52.- Shabih Fatma, Amir Hameed, Muhammad Noman, Temoor Ahmed, Muhammad Shahid, Mohsin Tariq, Imran Sohail, Romana Tabassum; ***“Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future”***, Protein and Peptide Letters 2018; 25(2):148-163.
- 53.- Zhanying Zhang, Ian M. Hara, Sagadevan Mundree, Baoyu Gao, Andrew S. Ball, Nanwen Zhu, Zhihui Bai and Bo Jin; ***“Biofuels from food processing wastes”***, Current Opinion in Biotechnology 2016, 38:97–105.
- 54.- Govinda R.: Timilsina Environment and Energy, Development Research Group, The World Bank, Washington, DC, USA; ***“Biofuels in the long-run global energy supply mix for transportation”***, Phil.Trans.R.Soc.A372:20120323.
- 55.- Lorenzo Favaro, Trudy Jansen, Willem Heber van Zyl; ***“Exploring Industrial and Natural Saccharomyces cerevisiae Strains for the Bio-Based Economy From Biomass: The Case of Bioethanol”***, Critical reviews in biotechnology, 2019 Sep;39(6):800-816.



- 56.- Cristina M. M. Machado; ***“Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe”***, OLADE/IICA, Agosto 2010.
- 57.- Atalla, R.H.; Isogai, A.; ***“Recent Developments in Spectroscopic and Chemical Characterization of Cellulose. In: Dumitriu, S. Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility”***, Second Edition. Marcel Decker. 123-157. 1998.
- 58.- BABETHANOL ***“New feedstock and innovative transformation process for a more sustainable development and production of lignocellulosic ethanol”***, (2010) Disponible: <http://babethanol.com/>
- 59.- Zhang Y-Hp; Himmel Me, Mielenz JR; ***“Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies”***, Biotechnology Advances 24(5): 452-481. 2006.
- 60.- Weiland, P.; ***“Bioethanol production: current state and perspectives”***, Applied Microbiology and Biotechnology. 85(4): 849-860. 2010.
- 61.- Wackett, L.P.; ***“Microbial-based fuels: science and technology”***, Microbial Biotechnology 1(3): 211– 225, 2008.
- 62.- US DEPARTMENT OF ENERGY (DOE) DOE; ***“Biomass to Biofuels Workshop Summary Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda”***, Rockville, Maryland: DOE, 2005. Site: <http://genomicscience.energy.gov/biofuels/2005workshop/b2blowres63006.pdf>
- 63.- US DEPARTMENT OF ENERGY (DOE); ***“Genomics: GTL Transforming Cellulosic Biomass”***, Rockville, Maryland: DOE: 2006, Disponible en: <http://genomicscience.energy.gov/biofuels/>
- 64.- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA (UAM); ***“Proyecto de investigación multidisciplinaria: la biomasa recurso sustentable esencial - el caso de la producción de etanol”***, 2010. Disponible en: [http://www.cua.uam.mx/docs/CNI/investigacion\\_dpt\\_biomasa.php](http://www.cua.uam.mx/docs/CNI/investigacion_dpt_biomasa.php)
- 65.- Sun, Y., Cheng, J.; ***“Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review”***, Bioresource Technology, 83(1): 1-11, 2002.
- 66.- Rojo, F.; ***“Biofuels from microbes: a comprehensive view”***, Microbial Biotechnology 1(3): 208– 210, 2008.
- 67.- Jianming Liu, Shruti Harnal Dantoft, Anders Würtz, Peter Ruhdal Jensen and Christian Solem; ***“A novel cell factory for efficient production of ethanol from dairy waste”***, Biotechnology for Biofuels, (2016) 9:33.
- 68.- Amir Hussain, Martin Kangwa and Marcelo Fernandez-Lahore; ***“Comparative analysis of stirred catalytic basket bio-reactor for the production of bio-ethanol using free and immobilized Saccharomyces cerevisiae cells”***, AMB Expr (2017) 7:158.
- 69.- Armando Gamarra J, Cuevas CM, Lescano G; ***“Production of ethanol by a stirred catalytic basket reactor with immobilized yeast cells”***, J Ferment Technol (1986) 64:25–28.
- 70.- Ulia Bleoanca, Gabriela Bahrim; ***“Overview on Brewing Yeast Stress Factors”***, Romanian Biotechnological Letters, Vol. 18, No. 5, 2013.

- 71.- Juan Carlos Villar; ***“Biotecnología industrial: el concepto de biorrefinería. La biomasa: tipos y aprovechamientos en Biorrefinería Lignocelulósica”***, Real Academia de Ingeniería (2013).
- 72.- ***“Manual sobre las Biorrefinerías en España”***, BioPlat – Gobierno de España: Ministerio de economía, industria y competitividad (2017).
- 73.- Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de abril de 2009 relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. Enlace: <https://www.boe.es/doue/2009/140/L00016-00062.pdf>
- 74.- FASEEEEEEEES ***“Las Biorrefinerías: aplicación a materiales y residuos lignocelulósicos. Horizontes 2050”***, Documento de Investigación del Instituto Español de Estudios Energéticos (IEEE) 05/2018.
- 75.- P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros y M.J. Negro; ***“Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process base don enzymatic hydrolysis: A review”***, Bioresource Technology, 101;4851-4861 (2010).
- 76.- Melyln González Cortés, Lilisbet Castellanos Gallo, Yaillet Albernas Carvajal, Erenio González Suárez; ***“La integración de procesos en el esquema de una biorrefinería”***, AFINIDAD LXXI, 568, Octubre - Diciembre 2014.
- 77.- Agencia Internacional de Energía, World Energy Outlook 2010; <http://www.iea.org>
- 78.- Directiva 2003/17/CE, relativa a la calidad de las gasolinas y gasóleo, y en el Real Decreto RD. 61/2006.
- 79.- Muhammad Bilal, Muhammad Zohaib Nawaz, Hafiz M N Iqbal, Jialin Hou, Shahid Mahboob, Khalid A Al-Ghanim, Hairong Cheng; ***“Engineering Ligninolytic Consortium for Bioconversion of Lignocelluloses to Ethanol and Chemicals”***, Protein Pept Lett. 2018; 25(2):108-119.
- 80.- Nasir Ali, Quan Zhang, Zi-Yong Liu, Fu-Li Li, Ming Lu, Xiang-Chen Fang; ***“Emerging Technologies for the Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Bio-Based Products”***, Appl Microbiol Biotechnol. 2020 Jan; 104(2):455-473.
- 81.- Manju Toor, Smita S Kumar, Sandeep K Malyan, Narsi R Bishnoi, Thangavel Mathimani, Karthik Rajendran, Arivalagan Pugazhendhi; ***“An Overview on Bioethanol Production From Lignocellulosic Feedstocks”***, Chemosphere. 2020 Mar; 242:125080.
- 82.- Anuj K Chandel, Bruna C M Gonçalves, Janice L Strap, Silvio S da Silva; ***“Biodelignification of Lignocellulose Substrates: An Intrinsic and Sustainable Pretreatment Strategy for Clean Energy Production”***, Crit Rev Biotechnol. 2015; 35(3):281-93.
- 83.- Katarzyna Robak, Maria Balcerek; ***“Review of Second Generation Bioethanol Production From Residual Biomass”***, Food Technol Biotechnol. 2018 Jun; 56(2):174-187.
- 84.- Adepu Kiran Kumar, Shaishav Sharma; ***“Recent Updates on Different Methods of Pretreatment of Lignocellulosic Feedstocks: A Review”***, Bioresour Bioprocess. 2017; 4(1):7.
- 85.- Shilva Shrestha, Xavier Fonoll, Samir Kumar Khanal, Lutgarde Raskin; ***“Biological Strategies for Enhanced Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass During Anaerobic Digestion: Current Status and Future Perspectives”***, Bioresour Technol. 2017 Dec; 245(Pt A):1245-1257.

- 86.- Devendra Prasad Maurya, Ankit Singla, Sangeeta Negi; ***“An Overview of Key Pretreatment Processes for Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Bioethanol”***, 3 Biotech. 2015 Oct; 5(5):597-609.
- 87.- Patrik R Lennartsson, Per Erlandsson, Mohammad J Taherzadeh; ***“Integration of the First and Second Generation Bioethanol Processes and the Importance of By-Products”***, Bioresour Technol. 2014 Aug; 165:3-8.
- 88.- ***“Construction of Advanced Producers of First- And Second-Generation Ethanol in Saccharomyces Cerevisiae and Selected Species of Non-Conventional Yeasts (Scheffersomyces Stipitis, Ogataea Polymorpha)”***, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2020 Jan; 47(1):109-132.
- 89.- Grazina Juodeikiene, Loreta Basinskiene, Daiva Vidmantiene, Tomas Makaravicius, Elena Bartkiene; ***“Benefits of  $\beta$ -xylanase for wheat biomass conversion to bioethanol”***, Journal of the Science of Food and Agriculture. 2012 Jan 15; 92(1):84-91.
- 90.- Agbogbo FK, Coward-Kelly G, Torry-Smith M, Wenger KS.; ***“Fermentation of glucose/xylose mixtures using P. stipites”***, Process Biochem. 2006; 41:2333–2336.
- 91.- Chen Y.; ***“Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review”***, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2011 May; 38(5):581-97.
- 92.- Akinori Matsushika, Hiroyuki Inoue, Tsutomu Kodaki and Shigeki Sawayama; ***“Ethanol Production From Xylose in Engineered Saccharomyces Cerevisiae Strains: Current State and Perspectives”***, Appl Microbiol Biotechnol. 2009 Aug; 84(1):37-53.
- 93.- Bao-Teng Wang, Shuang Hu, Xing-Ye Yu, Long Jin, Yun-Jia Zhu, Feng-Jie Jin; ***“Studies of Cellulose and Starch Utilization and the Regulatory Mechanisms of Related Enzymes in Fungi”***, Polymers (Basel). 2020 Mar 2; 12(3):530.
- 94.- Gorshkova T.A., Kozlova L.V., Mikshina P.V.; ***“Spatial structure of plant cell wall polysaccharides and its functional significance”***, Biochemistry. 2013; 78:836–853.
- 95.- Gustavo Pagotto Borin, Camila Cristina Sanchez, Amanda Pereira de Souza, Eliane Silva de Santana et al.; ***“Comparative Secretome Analysis of Trichoderma Reesei and Aspergillus Niger During Growth on Sugarcane Biomass”***, PLoS One. 2015 Jun 8; 10(6):e0129275.
- 96.- Raj Kumar, Sompal Singh and Om V Singh; ***“Bioconversion of Lignocellulosic Biomass: Biochemical and Molecular Perspectives”***, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2008 May; 35(5):377-391.
- 97.- Kamran Jawed, Syed Shams Yazdani and Mattheos Ag Koffas; ***“Advances in the Development and Application of Microbial Consortia for Metabolic Engineering”***, Metab Eng Commun. 2019 May 20; 9:e00095.
- 98.- Bader J., Mast-Gerlach E., Popović M.K., Bajpai R., Stahl U.; ***“Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology: coculture fermentations in biotechnology”***, J. Appl. Microbiol. 2010; 109:371–387.

- 99.- Aarthi Ravikrishnan, Lars M Blank, Smita Srivastava and Karthik Raman; ***“Investigating Metabolic Interactions in a Microbial Co-Culture Through Integrated Modelling and Experiments”***, Comput Struct Biotechnol J. 2020 Mar 30; 18:1249-1258.
- 100.- Alper H., Stephanopoulos G.; ***“Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential?”***, Nat Rev Microbiol. 2009; 7:715–723.
- 101.- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S.; ***“Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology”***, Microbiol Mol Biol Rev. 2002; 66:506–577.
- 102.- Ijoma G.N., Tekere M.; ***“Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds”***, Int J Environ Sci Technol. 2017;14:1787–1806.
- 103.- Marina O S Dias, Marcelo Pereira da Cunha, Rubens Maciel Filho, Antonio Bonomi, Charles D F Jesus and Carlos E V Rossell; ***“Simulation of Integrated First and Second Generation Bioethanol Production From Sugarcane: Comparison Between Different Biomass Pretreatment Methods”***, J Ind Microbiol Biotechnol. 2011 Aug; 38(8):955-66.
- 104.- Zhaoyang Xu, Fang Huang; ***“Pretreatment Methods for Bioethanol Production”***, Appl Biochem Biotechnol. 2014 Sep; 174(1):43-62.
- 105.- A. Hendriks and G Zeeman; ***“Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass”***, Bioresour Technol. 2009 Jan;100(1):10-8.
- 106.- Ángeles Martínez-Alcalá García; ***“Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosion”***, Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, 2012.
- 107.- . Gray, K.A.; ***“Cellulosic ethanol - state of the technology”***, International Sugar Journal. CIX (1299): p. 145-151, 2007.
- 108.- Santiago, D.S.; ***“Estudio de sustratos disponibles para la obtención de bioetanol”***, 5º Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, Campos de Jordao, Sao Paulo, Brasil (2005).
- 109.- Erickson, J.C.; ***“Overview of thermochemical biorefinery technologies”***, International Sugar Journal. CIX (1299): p. 163-173, 2007.
- 110.- Goldstein, I, S. and Easter, J., M.; ***“An improved process for converting cellulose to ethanol”***, Technical association of pulp and paper industry journal, 135-140, 1992.
- 111.- Philippidis, G.P., Smith, T.K.S., Wyman, C.E.; ***“Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process”***, Biotechnology and bioengineering. 41(9), p. 243-256, 1993.
- 112.- Mabel Viñals-Verde, Antonio Bell-García, Georgina Michelena-Álvarez y Marlen Ramil-Mesa ***“Obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica”***, ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar, 2012, vol. 46, no. 1 (enero-abril), pp. 7 – 16.
- 113.- Yaillet Albernas Carvajal; ***“Procedimiento para la síntesis y el diseño óptimo de plantas discontinuas de obtención de bioetanol empleando bagazo de caña de azúcar”***, Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas Especialidad Ingeniería Química (2013).

- 114.- Ramírez Lecca, Michael; Valverde Pérez, Alex; ***“Diseño de planta para la producción de etanol carburante a partir de la caña de azúcar”***, Biblioteca Digital – Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación (2010).
- 115.- Yenny del Carmen Velásquez Riascos, Jorge Enrique López; ***“Estudio de prefactibilidad para el diseño de una planta de etanol a partir de residuos de cosecha de caña de azúcar”***, Velásquez-Riascos, Y., & López, J.E. (2016).
- 116.- Verónica Capdevila, Viatcheslav Kafarov, Cristina Gely and Ana Pagano; ***“Simulación Del Proceso Fermentativo Para La Obtención De Bioetanol A Partir De Residuos De Arroz”***, Avances en Ciencias e Ingeniería - ISSN: 0718-8706. Av. cien. ing.: 6(2), 11-21 (Abril/Junio, 2015)
- 117.- Fabiola Serna, Luis Barrera, Héctor Montiel; ***“Impacto Social y Económico en el Uso de Biocombustibles ”***, J. Technol. Manag Innov. 2011, Volume 6, Issue 1.
- 118.- A Kotyk, A Kleinzeller; ***“Affinity of the Yeast Membrane Carrier for Glucose and Its Role in the Pasteur Effect”***, Biochim Biophys Acta. 1967 Feb 1; 135(1):106-11.
- 119.- P W Royt, A M MacQuillan; ***“The Pasteur Effect and Catabolite Repression in an Oxidative Yeast, Kluyveromyces Lactis”***, Antonie Van Leeuwenhoek. 1979; 45(2):241-52.
- 120.- C J Bulder; ***“Induction Of Petite Mutation And Inhibition Of Synthesis Of Respiratory Enzymes In Various Yeasts”***, Antonie Van Leeuwenhoek. 1964; 30:1-9.
- 121.- Gergely Ernő Lakatos, Karolína Ranglová, João Câmara Manoel, Tomáš Grivalský, Jiří Kopecký, Jiří Masojídek; ***“Bioethanol Production From Microalgae Polysaccharides”***, Folia Microbiol (Praha). 2019 Sep;64(5):627-644.
- 122.- Siti Hajar Mohd Azhar, Rahmath Abdulla, Siti Azmah Jambo, Hartinie Marbawi, Jualang Azlan Gansau, Ainol Azifa Mohd Faik and Kenneth Francis Rodrigues; ***“Yeasts in Sustainable Bioethanol Production: A Review”***, Biochem Biophys Rep. 2017 Mar 6; 10:52-61.
- 123.- Bodjui Olivier Abo, Ming Gao, Yonglin Wang, Chuanfu Wu, Hongzhi Ma and Qunhui Wang; ***“Lignocellulosic Biomass for Bioethanol: An Overview on Pretreatment, Hydrolysis and Fermentation Processes”***, Rev Environ Health. 2019 Mar 26; 34(1):57-68.
- 124.- ***“Fermentación Alcohólica - Bioetanol”***, Agro Waste – Agrupal – CSIC – CTC.
- 125.- Marvin Chávez-Sifontes and Marcelo E. Domine; ***“Lignina, Estructura Y Aplicaciones: Métodos De Despolimerización Para La Obtención De Derivados Aromáticos De Interés Industrial”***, Av. cien. ing.: 4(4), 15-46 (Octubre/Diciembre, 2013).
- 126.- P J Slininger, R J Bothast, M R Ladisch, M R Okos; ***“Optimum pH and Temperature Conditions for Xylose Fermentation by Pichia Stipitis”***, Biotechnol Bioeng. 1990 Mar 25; 35(7):727-31.
- 127.- Keith Roebuck, Anders Brundin and Mike Johns; ***“Response surface optimization of temperature and pH for the growth of Pachysolen tannophilus”***, Enzyme and Microbial Technology, Volume 17, Issue 1, January 1995, Pages 75-78.

- 128.- Juan Esteban Miño Valdés , José Luis Herrera, Erenio Gonzalez Suarez; “**Microvinificación con *Saccharomyces bayanus* y uva *Isabella* cultivada en Misiones**”, Centro Azúcar 38(4): 21-27, octubre-dic., 2011.
- 129.- Alice Zuin; “**Estrés oxidativo endógeno en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*: su papel en la regulación del envejecimiento cronológico y en la activación de la quinasa *StyI***”, TESIS DOCTORAL UPF / 2009.
- 130.- Michelle Chauvet y Rosa Luz González; “**Biocombustibles Y Cultivos Biofarmacéuticos: ¿Oportunidades O Amenazas?**”, El Cotidiano, enero-febrero, año 2008 /vol. 23, número 147.
- 131.- Carlos Ariel Cardona, María Isabel Montoya, Julian Andres Quintero y Óscar J. Sánchez; “**Evaluación económica del proceso de obtención de alcohol carburante a partir de caña de azúcar y maíz**”, DOAJ (2015).
- 132.- Jhonathan Mauricio Vargas-Barbosa y Jaime Alberto Giraldo-García, “**Modelo de entrenamiento en toma de decisiones relacionadas con gestión de producción y operaciones de un sistema de fabricación de bioetanol**”, ECKNE Vol. 12 Número 1, Junio 2015 • 7 – 16.
- 133.- Lema Rodicio JM y María López Abelairas; “**Retos y Oportunidades de los biocombustibles**”, (2009).
- 134.- Jaime Santillana y Julia Salinas de Santillana; “**Presentación del anuario estadístico de energía 2015 de BP**”, Ing. Químicos (UNI), M.S. in Ch.E. (U - Wisconsin Madison, U - Illinois Urbana Champaign, 2015.